

# **Analysen zur differentiellen Plasmazellhomöostase beim Menschen – Kontrolle des humoralen Immungedächtnisses**

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades  
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Immunologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Diplom-Ingenieur Henrik Eckhard Mei  
geboren am 12. November 1978 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Dr. h. c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter 1. Prof. Dr. Andreas Radbruch  
2. Prof. Dr. Thomas Dörner  
3. PD Dr. Michal Or-Guil

Tag der mündlichen Prüfung: 09. 12 . 2009



## Zusammenfassung

Das humorale Immungedächtnis wird von Plasmazellen vermittelt, deren Homöostase, insbesondere beim Menschen, in vielen Punkten unverstanden ist. Reife, dem humoralen Immungedächtnis zugrunde liegende Plasmazellen befinden sich im Knochenmark und entstehen aus B-Lymphozyten, die im Rahmen von Immunreaktionen in den sekundären lymphatischen Geweben aktiviert werden. Dabei werden zunächst Plasmablasten als unmittelbare Vorläufer der Plasmazellen gebildet. Plasmablasten translozieren aus den sekundären lymphatischen Organen in das Knochenmark über die Blutbahn und können dort nachgewiesen werden. Anhand der durchflusszytometrischen Detektion antigenspezifischer Plasmablasten nach Tetanusimmunisierung gelang es in dieser Arbeit, die simultane Zirkulation von im Rahmen einer Tetanusimmunisierung generierten HLA-DR<sup>stark</sup> exprimierenden Plasmablasten und funktionell distinkten reifen HLA-DR<sup>schwach</sup> exprimierenden Plasmazellen im peripheren Blut nachzuweisen. Kürzlich induzierte, antigenspezifische Plasmablasten und Plasmazellen mit unbekannter Lebensdauer und Antigenspezifität, lag im Blut nach einer sekundären Tetanusimmunisierung stets im Gleichgewicht vor, wodurch auf die stöchiometrische Mobilisierung reifer Plasmazellen des Knochenmarks durch systemisch induzierte Plasmablasten geschlossen wurde. Damit einhergehend wurden Plasmablasten im Blut als migratorisch und teilungsaktiv charakterisiert und unterschieden sich dahingehend von gleichzeitig nachweisbaren nicht-migratorischen, nicht teilungsaktiven Plasmazellen. Das Schicksal von Plasmazellen endet daher nicht generell, wie bisher angenommen, im Knochenmark. Die Verdrängung reifer Plasmazellen durch Plasmablasten stellt einen hier erstmalig postulierten Anpassungsmechanismus des humoralen Gedächtnisses dar, der die Aufnahme neuer Spezifitäten in das Gedächtnis unter Wahrung der Stabilität präexistierender Spezifitäten erlaubt.

Anders als im Rahmen einer Impfreaktion induzierte Plasmablasten, weisen Plasmablasten, die im Blut im immunologischen Gleichgewichtszustand zirkulieren, Kennzeichen mukosaler Immunreaktionen und entsprechenden Zellmigrationsverhaltens auf: sie exprimieren IgA als den für mukosale Immunantworten charakteristischen Antikörper sowie das mukosale Adhäsionsmolekül  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und den mukosalen Zellmigrationsrezeptor CCR10.

Wahrscheinlich wandern sie mit Hilfe dieser Rezeptoren aus dem Blut in mukosale Plasmazelldepots ein und können daher keinen Einfluß auf die Plasmazellen im Knochenmark nehmen. So bleibt die Stabilität des humoralen Gedächtnisses in der immunologischen Ruhephase gewahrt. Eine Anpassung des humoralen Gedächtnisses findet somit nur im Rahmen systemischer Immunreaktionen statt.

Die Produktion mukosaler Plasmablasten in der immunologischen Ruhephase wird von systemischen Immunreaktionen nicht beeinflusst und wird außerdem durch die Abwesenheit der Milz als wichtigem systemischem Immungewebe nicht unterbunden, was die Unabhängigkeit mukosaler und parenteraler Immunreaktionen auf Ebene der zirkulierenden Plasmablasten belegt. Auch unter der umfassenden therapeutischen Depletion von B-Zellen mit dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab bei Patienten mit rheumatoider Arthritis bleibt die Produktion mukosaler Plasmablasten bestehen. Dies belegt die autonome Realisierung mukosaler Antikörperantworten *in vivo* durch die Produktion mukosaler Plasmablasten, deren Vorläufer eine Zellpopulation nicht-zirkulierender, mukosaler und von der B-Zell-Depletion nicht vollständig beseitigter Gedächtnis-B-Zellen darstellen könnten. Überdies konnte zwischen den im Blut von Rheumapatienten zirkulierenden mukosalen Plasmablasten und der Aktivität der Rheumaerkrankung bzw. dem klinischen Ansprechen auf die Rituximab-Therapie kein zuverlässiger statistischer oder funktioneller Zusammenhang festgestellt werden.

Die vorliegende Arbeit enthält neue experimentelle Erkenntnisse und konzeptionelle Ansätze zur differentiellen Homöostase mukosaler und systemischer Antikörperantworten und zur Aufrechterhaltung und Regulation des humoralen Gedächtnisses.

Schlagwörter: humorales Immungedächtnis, Plasmablast, Plasmazelle, mukosale Immunreaktion, Tetanusimmunisierung, B-Zell-Depletion, Rituximab, Splenektomie, IgA, IgG, Zellmigration, Zelladhäsion, Antikörper, B-Zelle

## Abstract

Humoral memory becomes apparent by the persistence of specific serum antibody titres and is provided by antibody-secreting plasma cells in the bone marrow. The homeostasis of plasma cells and the regulation of humoral memory, especially in man, are poorly understood.

Plasma cells are generated within immune responses from activated B cells via an intermediate cell differentiation stage, the plasmablasts. During their translocation from secondary lymphoid tissues to the bone marrow, they become detectable in the peripheral blood. Using a flow cytometric approach to detect antigen specific plasmablasts induced by a tetanus booster vaccination, the simultaneous presence of newly generated HLA-DR<sup>high</sup> plasmablasts and functionally distinct HLA-DR<sup>low</sup> mature plasma in the blood was described in detail in the current thesis. Migratory and dividing plasmablasts and non-migratory, non-dividing plasma cells were always detected at comparable ratio in the peripheral blood, reflecting their stoichiometric relationship. Based on this observation, the mobilization of mature plasma cells from the bone marrow by newly generated plasmablasts induced in a systemic immune response was hypothesized. Thus, the fate of plasma cells does not generally end in the bone marrow, as assumed hitherto. The mobilization of mature plasma cells by plasmablasts represents an adaption mechanism of the humoral memory, that is described in the present work for the first time. This mechanism would allow the humoral memory to accomodate a new antigen specificity while maintaining the stability of pre-existing specificities.

Different from plasmablasts induced by a systemic vaccination, plasmablasts generated in the immunological steady-state show features of mucosal immune reactions and respective cell migration properties, in that they express IgA,  $\alpha_4\beta_7$  integrin and a functional mucosal cell chemotaxis receptor, CCR10. Consistently, they most likely immigrate into mucosal plasma cell depots, such as the lamina propria, and do not interfere with plasma cells of the bone marrow. Consequently, the stability of humoral memory is preserved in steady-state and adaption of the humoral memory occurs exclusively during systemic immune reactions.

The production of mucosal plasmablasts during steady-state is independent of concurrent systemic immune reactions and is not impaired in splenectomized individuals, showing the independency of systemic (parenteral) and mucosal immune reactions at the level of circulating plasmablasts.

The chronic production of circulating mucosal plasmablasts is also continued during the comprehensive (therapeutic) depletion of B cells with the anti-CD20 antibody rituximab in patients with rheumatoid arthritis. This reflects autonomous execution of a mucosal antibody response *in vivo* through the generation of mucosal plasmablasts. These plasmablasts derive most likely from mucosal precursor B cells that do not (re-)circulate, are not (entirely) depleted by rituximab and show molecular features of memory B cells. A reliable relation between the persistent generation of mucosal plasmablasts and the disease activity in patients with rheumatoid arthritis or clinical responsiveness to rituximab was not observed.

The present work addresses plasma cell homeostasis in man to understand the regulation of humoral memory, with a focus on

- differential behaviour of plasmablasts induced in systemic vs. mucosal immune responses and
- functional distinction between recently generated plasmablasts and mature plasma cells.

Based on experimental results, a model explaining the stability and adaptability of humoral memory was established.

Keywords: humoral memory, plasmablast, plasma cell, immunity, mucosal, immunological memory, tetanus, B cell depletion, rituximab, splenectomy, vaccination, IgA, IgG, cell migration, cell adhesion, antibody, B cell

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Bedeutung des immunologischen Gedächtnisses.....	1
1.2	Die Rolle von B-Zellen, Plasmazellen und Antikörpern im Immunsystem .....	3
1.2.1	<u>Das angeborene Immunsystem.....</u>	3
1.2.2	<u>Die Funktion von Antigenrezeptoren bei der adaptiven Immunantwort und die Ausprägung des immunologischen Gedächtnisses.....</u>	4
1.2.3	<u>B-Zellen, ihre Entwicklung und antigenabhängige Differenzierung .....</u>	6
1.2.3.1	Die Struktur und Funktion von Immunglobulinen.....	7
1.2.3.2	Erzeugung der Antigenrezeptordiversität durch V(D)J-Rekombination während der frühen B-Zell-Entwicklung.....	9
1.2.3.3	Plasmazellen als Ergebnis peripherer, antigenabhängiger B-Zell-Differenzierung bei adaptiven Immunantworten .....	10
1.2.3.4	Keimzentrumsreaktion, Affinitätsreifung und Ig-Klassenwechsel .....	11
1.2.3.5	Die Rolle von B-Zellen bei der Autoimmunität und ihre Depletion durch die B-Zell-gerichtete Therapie mit Rituximab .....	12
1.3	Die Kontrolle des humoralen Gedächtnisses durch die Plasmazellhomöostase ...	14
1.3.1	<u>Produktion von Plasmazellen und Antikörpersekretion .....</u>	17
1.3.2	<u>Überleben und Apoptose von Plasmazellen .....</u>	19
1.3.3	<u>Herkunft und Migrationsziel zirkulierender Plasmazellen.....</u>	20
1.3.4	<u>Molekulare Komponenten des gewebspezifischen Wanderungsverhaltens von Plasmazellen .....</u>	22
1.3.4.1	Adhäsionsmoleküle auf Plasmazellen.....	23
1.3.4.2	Chemokinrezeptoren auf Plasmazellen.....	24
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Probanden, Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
3.1	Gesunde Probanden und Patienten.....	29
3.2	Probenmaterial.....	30
3.3	Laborausrüstung .....	31
3.4	Isolation humaner Primärzellen .....	33
3.4.1	<u>Herstellung von Zellsuspensionen.....</u>	33
3.4.2	<u>Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung mononukleärer Zellen .....</u>	34

<b>3.5</b>	<b>Durchflusszytometrie und Zellsortierung .....</b>	<b>35</b>
3.5.1	<i>Methode und Prinzip der Durchflusszytometrie .....</i>	35
3.5.2	<i>Durchführung durchflusszytometrischer Analysen .....</i>	37
3.5.3	<i>Durchflusszytometrische Detektion von Plasmablasten und Plasmazellen.....</i>	41
3.5.4	<i>Detektion tetanusspezifischer Plasmablasten .....</i>	44
3.5.5	<i>Durchflusszytometrische Zellzahlbestimmung.....</i>	44
<b>3.6</b>	<b>In vitro Transmigrationsexperimente .....</b>	<b>45</b>
3.6.1	<i>Versuchsprinzip des Transmigrationsexperiments.....</i>	45
3.6.2	<i>Durchführung des in vitro Transmigrationsversuchs .....</i>	46
<b>3.7</b>	<b>Detektion von Plasmazellen mit Hilfe des EliSpot-Versuchs .....</b>	<b>47</b>
3.7.1	<i>Versuchsprinzip des EliSpot-Assays.....</i>	47
3.7.2	<i>Material, Chemikalien und Protokoll für das EliSpot-Verfahren .....</i>	48
<b>3.8</b>	<b>Zellzahlbestimmung.....</b>	<b>51</b>
<b>3.9</b>	<b>Nachweis in vitro sezernierter Immunglobuline .....</b>	<b>52</b>
3.9.1	<i>PBMZ-Kultur.....</i>	52
3.9.2	<i>Prinzip und Durchführung des ELISA-Verfahrens.....</i>	52
3.9.3	<i>Die Multiplex-Analyse .....</i>	54
<b>3.10</b>	<b>Abbildungen und statistische Auswertung .....</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakteristika zirkulierender antikörpersezernierender Zellen nach sekundärer Tetanusimmunisierung.....</b>	<b>55</b>
4.1.1	<i>Detektion tetanusantigenspezifischer B-Zellen .....</i>	55
4.1.2	<i>Anzahl und Kinetik antigenspezifischer Plasmablasten nach sekundärer Tetanusimmunisierung.....</i>	57
4.1.3	<i>Der Phänotyp antigenspezifischer Plasmablasten im peripheren Blut nach Tetanusimmunisierung.....</i>	59
4.1.4	<i>Charakteristisch für antigenspezifische Plasmablasten 6 - 7 Tage nach Tetanusimmunisierung ist die starke Expression von HLA-DR .....</i>	63
4.1.5	<i>Antigenspezifische Plasmablasten migrieren in vitro gegen CXCL9 und CXCL12.....</i>	65
4.1.6	<i>Stöchiometrische Mobilisierung reifer HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen im Rahmen einer systemischen Immunantwort .....</i>	68
4.1.7	<i>Die Spezifität antikörpersezernierender Zellen des Blutes 7 Tage nach sekundärer Tetanusimmunisierung.....</i>	69



<b>4.2</b>	<b>Charakteristika zirkulierender antikörpersezernierender Zellen im Gleichgewichtszustand.....</b>	<b>70</b>
4.2.1	<i>Plasmablasten und Plasmazellen des Gleichgewichtszustandes exprimieren IgA, CCR10 und <math>\beta_2</math>-Integrin.....</i>	70
4.2.2	<i>Der Phänotyp von Plasmablasten und Plasmazellen im immunologischen Gleichgewichtszustand.....</i>	76
4.2.3	<i>Plasmablasten des Gleichgewichtszustandes migrieren in vitro gegen das mukosale Chemokin CCL28.....</i>	78
4.2.4	<i>Die chronische Generierung zirkulierender Plasmablasten im Gleichgewichtszustand ist unabhängig von der Milz.....</i>	80
4.2.5	<i>Eigenschaften von Plasmazellen im humanen Knochenmark.....</i>	82
<b>4.3</b>	<b>Persistierende Produktion mukosaler Plasmablasten unter B-Zell-depletierender Therapie .....</b>	<b>84</b>
4.3.1	<i>Klinisches Ansprechen auf die B-Zell-Depletion .....</i>	85
4.3.2	<i>Nachweis zirkulierender Plasmablasten und Plasmazellen nach therapeutischer Depletion CD20-exprimierender B-Zellen.....</i>	86
4.3.3	<i>Produktion von proliferierenden und migratorischen Plasmablasten mit mukosalem Phänotyp während therapeutischer B-Zell-Depletion .....</i>	93
4.3.4	<i>Reaktivität zirkulierender IgA-sezernierender Plasmablasten und Plasmazellen unter B-Zell-Depletion .....</i>	95
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>99</b>
<b>5.1</b>	<b>Kinetik, Phänotyp und Migrationsverhalten antigenspezifischer Plasmablasten nach einer sekundären Tetanusimmunisierung .....</b>	<b>100</b>
5.1.1	<i>Nachweis antigenspezifischer B-Zellen nach einer Tetanusimmunisierung .....</i>	101
5.1.2	<i>Anzahl und Kinetik tetanusspezifischer Plasmablasten im peripheren Blut.....</i>	102
5.1.3	<i>Migrationsziel tetanusspezifischer Plasmablasten.....</i>	104
<b>5.2</b>	<b>Stöchiometrische Mobilisierung HLA-DR<sup>schwach</sup> exprimierender Plasmazellen durch migratorische tetanusspezifische HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten .....</b>	<b>107</b>
5.2.1	<i>Simultaner Nachweis antigenspezifischer Plasmablasten und polyklonaler Plasmazellen im peripheren Blut nach einer Tetanusimmunisierung.....</i>	107
5.2.2	<i>Stöchiometrische Mobilisierung reifer Plasmazellen durch frisch generierte Plasmablasten.....</i>	108
5.2.3	<i>Unterschiedliche Kompetenz von Plasmablasten zur Gedächtnisausbildung.....</i>	110
5.2.4	<i>Das Schicksal mobilisierter Plasmazellen.....</i>	110
5.2.5	<i>Der Mechanismus der Plasmazellmobilisierung .....</i>	112

<b>5.3</b>	<b>Zirkulierende Plasmablasten und Plasmazellen im immunologischen</b>	
	<b>Ruhezustand .....</b>	<b>112</b>
5.3.1	<i><u>Chronische Produktion mukosaler Plasmablasten im immunologischen Gleichgewicht.....</u></i>	113
5.3.2	<i><u>Die Produktion der Plasmablasten im immunologischen Gleichgewicht ist unabhängig von der Milz .....</u></i>	116
5.3.3	<i><u>Induktion mukosaler Plasmablasten als Antwort auf symbiotische Bakterien .....</u></i>	116
5.3.4	<i><u>Unabhängige Regulation mukosaler und systemischer Immunantworten auf der Ebene zirkulierender Plasmablasten.....</u></i>	117
5.3.5	<i><u>Im immunologischen Gleichgewicht generierte Plasmablasten interferieren nicht mit den Plasmazellen des humoralen Gedächtnisses .....</u></i>	118
5.3.6	<i><u>Simultane Zirkulation mukosaler Plasmablasten und Plasmazellen im immunologischen Gleichgewichtszustand.....</u></i>	120
<b>5.4</b>	<b>IgA-sezernierende Plasmazellen im menschlichen Knochenmark.....</b>	<b>120</b>
<b>5.5</b>	<b>Autonome Produktion von Plasmablasten während konditioneller Depletion</b>	
	<b>CD20-exprimierender B-Zellen mit Rituximab .....</b>	<b>122</b>
5.5.1	<i><u>Klinisches Ansprechen auf die Rituximab-Therapie.....</u></i>	123
5.5.2	<i><u>Zirkulierende Plasmablasten belegen die Persistenz Rituximab-refraktärer B-Zellen.....</u></i>	125
5.5.3	<i><u>Autonome Produktion mukosaler Plasmablasten unter B-Zell-Depletion.....</u></i>	128
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>131</b>
	<b>Referenzen.....</b>	<b>135</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>i</b>
	<b>Berechnungen .....</b>	<b>i</b>
	<b>Abkürzungen und Maßeinheiten .....</b>	<b>iii</b>
	<b>Veröffentlichungen und Weiterbildung im Rahmen der Promotion .....</b>	<b>v</b>
	<b>Förderung .....</b>	<b>x</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>xi</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>xii</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung des immunologischen Gedächtnisses

Das Immunsystem trägt essentiell zur Integrität des menschlichen Körpers bei. Es verteidigt ihn gegen krankheitserregende Stoffe, Lebewesen und Parasiten (Pathogene). Seit der Identifikation des Blutserums als wichtigem Träger humoraler Immunität um 1890 [1] und der späteren Einführung der Technologie des Impfens nahmen die durchschnittliche Lebenserwartung und Lebensqualität deutlich zu, während die Mortalität zurückging.

Durch Impfungen erfolgt die gezielte Anpassung des Immunsystems an einen speziellen Erreger, sodass der Organismus gegen diesen Erreger eine lang anhaltende Immunität erlangt („Immunisierung“). Dadurch können tödliche oder schwerwiegende Folgen von Infektionen abgewendet werden. Einst verheerenden Krankheiten kann heute durch Impfungen systematisch und effizient vorgebeugt werden, sodass beispielsweise die Pocken praktisch gar nicht mehr auftreten. Gleichwohl stellen Infektionskrankheiten heutzutage die zweithäufigste Todesursache weltweit dar [2] und es treten neuartige humanpathogene Erreger wie *human immunodeficiency virus* (HIV) oder der Influenzavirus A/H5N1 auf, gegen die das Immunsystem nicht vorbereitet ist.

Daher wird die Technologie des Impfens kontinuierlich weiterentwickelt, um

- i) das Spektrum der Zielstrukturen und der Erreger zu verbreitern (beispielsweise *Plasmodium ssp.* als Erreger der Malaria, HIV, krebsassoziierte Pathogene oder entartete Zellen selbst),
- ii) die Anwendungssicherheit von Impfstoffen zu erhöhen und Nebenwirkungen zu reduzieren,
- iii) die Anwendung letzterer zu vereinfachen (orale statt subkutaner oder intramuskulärer Applikation, seltener notwendige Auffrischungsimpfungen) und im Zusammenhang damit
- iv) ein robusteres immunologisches Gedächtnis zu induzieren, das möglichst lebenslang spezifische Immunität gewährleistet.

Das immunologische Gedächtnis ist die Fähigkeit des Immunsystems, eine einmal gegen ein Antigen ausgeführte Immunantwort *in physischer Abwesenheit des Antigens* aufrechtzuerhalten, fortzusetzen und bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Antigen spezifisch zu reaktivieren, sodass der Erreger bei Re-Exposition mit ihm schneller und effizienter bekämpft wird als beim Erstkontakt. Es basiert vor allem auf Lymphozyten, die nach Antigenkontakt in spezialisierte Gedächtnis-Zellen differenzieren.

Dasselbe immunologische Gedächtnis kann jedoch auch eine nachteilige Rolle bei Erkrankungen des Immunsystems spielen. Einerseits können bei den komplexen biologischen Prozessen des Immunitätserwerbs und der Gedächtnisausprägung Lymphozyten entarten und sogenannte Lymphome bilden. Andererseits werden bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen körpereigene Strukturen fälschlicherweise vom Immunsystem als „Erreger“ bzw. „fremd“ erkannt. Folglich werden bei diesen Patienten Immunreaktionen gegen körpereigene Gewebe etabliert (Autoimmunreaktionen), die durch die ständige Präsenz der körpereigenen Auslöser aufrechterhalten und chronisch werden.

Autoimmunität hat die Funktionseinschränkung der betroffenen Gewebe bis hin zu deren Funktionsverlust zur Folge, geht mit Schmerzen einher und kann zum Tod führen. Solche Autoimmunreaktionen können, wie eine Impfreaktion, ein (schädliches) Immungedächtnis induzieren. Hat sich bei Autoimmunpatienten einmal ein immunologisches Gedächtnis gegen körpereigene Strukturen etabliert, ist die Erkrankung offensichtlich besonders schwierig zu behandeln.

Das Immungedächtnis kann folglich in ein- und demselben Organismus schützende und schädliche Funktionen ausüben. In der Medizin sind deshalb Strategien zur Manipulation des Immungedächtnisses gefragt. Einerseits soll dieses Gedächtnis bei Impfungen besonders stark ausgeprägt werden und lang anhaltend sein, im anderen Fall soll der schädliche Teil des Immungedächtnisses möglichst selektiv eliminiert werden. Beides konnte bisher nicht hinreichend erzielt werden und die molekularen und zellulären Grundlagen des Immungedächtnisses und seine Regulation sind in vielen Punkten noch immer unklar. Ferner werden die genauen Mechanismen der Unterhaltung des immunologischen Gedächtnisses kontrovers diskutiert [3].

Grundsätzlich beruht das Immungedächtnis mit seinen Funktionen auf dem zeitlich koordinierten Zusammenwirken verschiedener Proteine und Immunzellen

untereinander, deren Wechselwirkung mit ihren Mikroumgebungen im Körper und mit der Umwelt des Menschen. Das Immunsystem (bzw. -gedächtnis) nutzt zur spezifischen Bekämpfung von Pathogenen direkt zellvermittelte Funktionen sowie lösliche Proteine (Antikörper). Die Ausprägung von Immunschutz durch Antikörper wird als humorale („die Körperflüssigkeiten betreffende“) Immunität bezeichnet. Analog dazu spricht man beim langfristigen Überdauern von spezifischen Antikörpertitern von humoralem oder serologischem Immungedächtnis.

## **1.2 Die Rolle von B-Zellen, Plasmazellen und Antikörpern im Immunsystem**

Die humorale Immunität wird durch lösliche Antikörper vermittelt. Antikörper können an Pathogene binden, wodurch diese entweder direkt neutralisiert oder für ihren Abbau durch andere Komponenten des angeborenen Immunsystems (1.2.1) spezifisch markiert werden. Lösliche Antikörper werden ausschließlich von ausdifferenzierten B-Lymphozyten (1.2.3), sogenannten Plasmazellen (PZ), und ihren unmittelbaren Vorstufen, den Plasmablasten (PB), gebildet. Die Ausprägung humoraler Immunität und des humoralen Gedächtnisses hängt somit wesentlich von der Qualität und Quantität der Plasmazellproduktion und den spezifischen Eigenschaften der generierten Plasmazellen ab (1.3).

Sind die Mechanismen der B- und Plasmazelldifferenzierung gestört (z. B. Toleranzbruch), können autoreaktive Plasmazellen und Antikörper entstehen, die häufig zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beitragen (1.2.3.5).

Verschiedene biologische Faktoren und Prozesse haben Einfluss auf die Art, die Produktion, die Menge und die Persistenz von Plasmazellen (1.2 und 1.3). Basierend auf der Analyse dieser und anderer Eigenschaften wurden verschiedene Konzepte zur Regulation des humoralen Gedächtnisses postuliert (1.3).

### **1.2.1 Das angeborene Immunsystem**

Das Immunsystem unterscheidet zwischen Pathogenen und körpereigenen oder tolerogenen Substanzen und reagiert auf die Erkennung einer Substanz (Antigen) mit Immunabwehr bzw. Toleranz. Als Folge der Immunabwehr wird eine Entzündung initiiert, deren Eigenschaften und Effekte von der Art des Antigens abhängen und

den weiteren Verlauf der Immunantwort bestimmen. Bei erstmaligem Antigenkontakt werden stets Mechanismen des „angeborenen“ immanenten Immunsystems aktiviert. Wenn die angeborene Immunabwehr nicht zur Beseitigung der Infektion ausreicht, wird das „angepasste“ adaptive Immunsystem aktiviert. Im Rahmen adaptiver Immunantworten werden dann Lymphozyten aktiviert, woraufhin unter anderem die Ausprägung immunologischen Gedächtnisses zustande kommt (1.2.2).

Das angeborene Immunsystem ist immer verfügbar und reagiert sofort auf eine Infektion, jedoch mit unspezifischen Effektormechanismen, die zudem nicht alle Pathogentypen erfassen. Es beruht u. a. auf der Funktion phagozytierender Zellen, natürlicher Killer (NK)-Zellen sowie dem Komplementsystem und Zytokinen. Die angeborene Immunität spielt bei der Abwehr von Bakterien sowie bei der Kontrolle einer Infektion in ihrer frühen Phase, solange die adaptive Immunität noch nicht aktiv ist, eine wichtige Rolle. Die adaptive Immunantwort ihrerseits kann von Faktoren des angeborenen Immunsystems beeinflusst werden:

- i) durch die Produktion von Zytokinen, die den Charakter der adaptiven Immunantwort mitbestimmen,
- ii) durch die Eliminierung antikörpermarkierter Pathogene durch Phagozytose und
- iii) durch die Induktion und Aufrechterhaltung einer Entzündung.

Letztere bewirkt die effiziente Initialisierung einer adaptiven Immunantwort durch den Transport von Antigen und antigenbeladenen Zellen in lymphatische Gewebe durch verstärkten Lymphfluss.

### 1.2.2 Die Funktion von Antigenrezeptoren bei der adaptiven Immunantwort und die Ausprägung des immunologischen Gedächtnisses

Charakteristisch für die adaptive Immunantwort ist die Funktion der T- und B-Lymphozyten, die im Rahmen einer solchen durch die spezifische Bindung von Antigen mittels spezieller Antigenrezeptoren (sogenannter T-Zell- bzw. B-Zell-Rezeptoren) aktiviert werden. Diese Aktivierung bewirkt ihre Differenzierung zu T- und B-Effektorzellen,

- i) die spezifisch solche Antigene bzw. Erreger bekämpfen, durch die sie zuvor

aktiviert wurden und

- ii) deren Antigenrezeptoren während ihrer Differenzierung durch den Prozess der klonalen Selektion (Proliferation und Affinitätsreifung) eine höhere Affinität für das Antigen erlangen (1.2.2 und 1.2.3).

Daneben werden bei adaptiven Immunantworten T- und B-Gedächtniszellen gebildet, die ebenfalls der qualitativen Verbesserung durch klonale Selektion unterliegen, aber nicht unmittelbar an der Bekämpfung der akuten Infektion beteiligt sind. Im Falle des wiederholten Antigenkontakts differenzieren diese jedoch wiederum zu hoch effizienten Effektorzellen. Das Gedächtnis bei B-Zellen basiert auf (langlebigen) Gedächtnis-B-Zellen (reaktives Gedächtnis) [4] und der Sekretion von Antikörpern durch langlebige Plasmazellen (protektives Gedächtnis) [5, 6]. Unter den T-Lymphozyten können sowohl  $CD8^+$  zytotoxische als auch  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen protektives bzw. reaktives Immungedächtnis bereitstellen. Lymphozyten vermitteln somit die Anpassungsfähigkeit des Immunsystems und sind die unmittelbaren Träger des zellulären immunologischen Gedächtnisses.

Die Strategie der adaptiven Immunabwehr basiert auf der Verfügbarkeit eines Antigenrezeptorrepertoires, welches praktisch jedes Antigen erkennen kann. Jeder reife, naive (d. h. antigen-unerfahrene) Lymphozyt trägt einen einzigartigen Antigenrezeptor, dessen molekulare Struktur und entsprechende Antigenspezifität durch einen komplexen genetischen Diversifizierungsprozess während der Lymphozytenentwicklung festgelegt wird (1.2.2 und 1.2.3.2). Damit zirkulieren kontinuierlich Millionen verschiedener aktivierungsfähiger Lymphozyten durch Blut, Lymphe und lymphatische Organe.

Bindet der Antigenrezeptor eines Lymphozyten ein passendes Antigen, wird genau diese Zelle aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung angeregt (klonale Selektion) [7-9]. Der entstehende Klon von Effektorlymphozyten trägt dieselbe Spezifität wie der anfänglich aktivierte Lymphozyt.

Im Rahmen der stochastischen Diversifizierung der Antigenrezeptoren werden auch Lymphozyten mit Rezeptoren gebildet, die körpereigene (Auto-) Antigene erkennen können. Solche Zellen werden im gesunden Immunsystem durch den Prozess der klonalen Deletion während früher Differenzierungsschritte aus dem Lymphozytenrepertoire entfernt [7].

Eine adaptive Immunantwort beginnt mit der Aufnahme und Verarbeitung von Antigen durch dendritische Zellen, die dabei aktiviert werden und zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) heranreifen. APZ aktivieren primär T-Lymphozyten durch Antigenpräsentation und gleichzeitige Freisetzung von Zytokinen, aber auch direkt B-Lymphozyten [10]. Die Aktivierung der T-Lymphozyten führt u. a. zu ihrer Differenzierung in T-Helfer-Zellen, die im Rahmen eines direkten Zell-Zell-Kontakts B-Lymphozyten aktivieren können, die durch dasselbe Antigen ebenfalls aktiviert wurden (immunologische Synapse). Dabei setzt die T-Helfer-Zelle Zytokine frei, die die B-Zelle zur Differenzierung in Plasmazellen bzw. in Gedächtnis-B-Zellen anregen (1.2.3).

### 1.2.3 B-Zellen, ihre Entwicklung und antigenabhängige Differenzierung

Die Bezeichnung „B-Lymphozyten“ hängt mit dem Organ, in dem sie erstmals beschrieben wurden, zusammen, der *Bursa fabricii*, dem blutbildenden Organ der Vögel. Bei Erwachsenen werden (sogenannte konventionelle) B-Zellen kontinuierlich im Knochenmark aus lymphoiden Vorläuferzellen generiert, die ihrerseits aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen entstehen. Im Rahmen der Embryonalentwicklung werden B-Zellen in der fötalen Leber gebildet, von denen sich einige in die Peritonealhöhle absiedeln, wo sie eine distinkte, sich selbst erhaltende Entwicklungslinie bilden (B1-Zellen) [11-13]. Ihr Beitrag zur Antikörperproduktion in mukosa-assoziierten Immungeweben wird unterschiedlich beurteilt [11, 14-16].

Das gemeinsame Hauptmerkmal von B-Lymphozyten ist jedoch die Expression von Immunglobulinen (Ig) als membranständigen B-Zell-Rezeptoren oder als löslichen Antikörpern. Im Gegensatz zum Antigenrezeptor der T-Lymphozyten kann der B-Zell-Rezeptor (BZR) dreidimensionale Antigenstrukturen spezifisch erkennen.

Diese Antikörper entsprechen der löslichen Form des spezifischen BZR der ihnen zugrunde liegenden B-Zelle und sind, weitgehend unabhängig von der Lokalisation der Plasmazellen, systemisch im Blut, in den Lymphen und im interzellulären Raum nachweisbar. Zudem werden sogenannte sekretorische Antikörper spezifisch aus dem Körperinneren heraus an die Schleimhautoberflächen transportiert (1.2.3.1). Die Produktion von spezifischen Antikörpern durch Plasmazellen stellt die



Haupteffektorfunktion der B-Zellen dar. Daneben präsentieren B-Zellen MHC-II-gebundene Antigene und produzieren Zytokine [17], was wiederum der Kontrolle und Optimierung der Antikörperproduktion dient.

#### 1.2.3.1 Die Struktur und Funktion von Immunglobulinen

Jeder B-Lymphozyt exprimiert genau eine molekular determinierte Art des BZR bzw. Antikörpers. Er besteht aus je zwei identischen schweren (50 kDa) und leichten (25 kDa) Polypeptidketten, die jeweils eine konstante und eine variable Region besitzen (Abb. 1A). Die variable Region enthält die CDR (*complementarity determining regions*), welche den spezifischen Kontakt zum Antigen vermitteln.

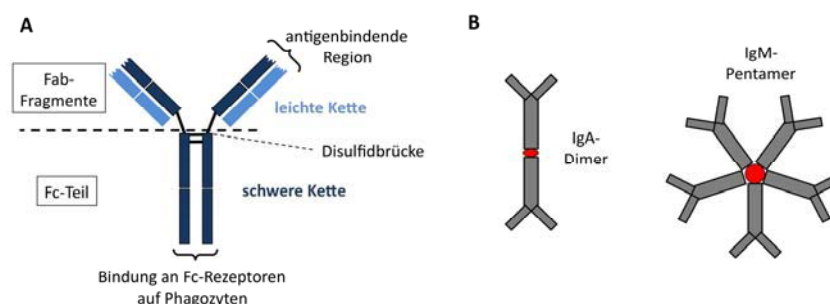
Aufgrund dieser molekularen Wechselwirkung wird ein Antigen spezifisch durch einen Antikörper markiert, wobei auch nicht direkt antigenkontaktierende Peptidsequenzen der Antikörper (*framework* Regionen) Einfluss auf die Antigenbindung nehmen können. Phagozyten erkennen den Fc-Teil des Antikörpers (Abb. 1A) als Abbausignal für die antikörpergebundene Substanz. Neben der Neutralisierung molekularer Pathogene (Toxine) und der Markierung komplexer Pathogene für die Phagozytose (Opsonierung) beeinflussen einmal gebildete Antikörper die Ausprägung weiterer humoraler Immunantworten [18, 19].

Während die Gensequenzen der antigenbindenden Region somatischer Diversifizierung und Hypermutation unterliegen („hypervariable Region“) und eine nahezu unbegrenzte Anzahl Genversionen (sogenannte Spezifitäten) hervorbringen (1.2.3.2), können vom Fc-Teil 5 Varianten durch Mechanismen des Ig-Klassenwechsels gebildet werden (Isotypen, 1.2.3.4). Die Isotypen IgG, IgA, IgM, IgE kommen jeweils sowohl in membrangebundener als auch in sezernierter, IgD nur in membrangebundener Form vor. Gelöst liegen IgG und IgE als Monomere vor, wobei dem IgG als häufig hochaffinem Antikörper in dominierender Konzentration im Blutserum [20] eine besondere Bedeutung zukommt. IgE liegt bei Gesunden in geringer Konzentration vor und spielt bei allergischen Reaktionen und der Parasitenabwehr eine Rolle [21, 22]. IgM und IgA können als Monomere und Polymere auftreten. Die Polymerisierung bedingt den Einbau der *joining* (J)-Kette (IgJ) bei IgA-Dimeren und IgM-Pentameren (Abb. 1B), nicht aber bei IgM-Hexameren.

Der Einbau der J-Kette ermöglicht die Transzytose des Antikörperpolymers durch Epithelzellen der Schleimhäute [23-26]. Hierzu wird die J-Kette eines Antikörperpolymers von dem polymeren Immunglobulinrezeptor (pIgR) auf der basolateralen Seite glandulärer Epithelzellen gebunden, das Polymer durch die Zellen transportiert und auf der luminalen Seite abgesichert. Dabei verbleibt die sogenannte sekretorische Komponente am sekretierten IgA-Dimer.

Die Antigenaffinität polymerer Antikörper ist meist niedrig. Durch die Polymerbildung steht eine höhere Anzahl von Bindungsstellen für die Antigenbindung zur Verfügung und steigert somit die Avidität und die durchschnittliche Interaktionszeit mit dem Antigen.

Antikörper werden im endoplasmatischen Retikulum von B- und Plasmazellen hergestellt und posttranslational durch Disulfidbrückenbildung, Faltung, Zusammensetzung, Glykosylierung und ggf. Polymerisierung modifiziert.



**Abb. 1: Aufbau und grundlegende Funktionen von Antikörpern und Antikörperpolymeren.**

(A) Schematische Darstellung eines Antikörpermonomers. Die variable Region des Moleküls bindet spezifisch an das Antigen, während der Fc-Teil von entsprechenden von Phagozyten exprimierten (Fc-) Rezeptoren erkannt wird. Die Fc (*fragment, crystallizable*)- und F(ab) (*fragment, antigen binding*)-Fragmente wurden durch die Proteolyse von Antikörpern mit Papain dargestellt und funktionell beschrieben. (B) IgA-Dimere und IgM-Pentamere enthalten die J-Kette (rot), die i) das Polymer stabilisiert, ii) seinen Transport in die Körpersekrete durch Interaktion mit pIgR vermittelt und iii) es dort vor Degradation schützt.

Membrangebundene Antikörper bilden zusammen mit dem für die Signaltransduktion notwendigen  $\text{Ig}\alpha/\text{Ig}\beta$ -Komplex den BZR, durch dessen spezifische Bindung an ein Antigen die B-Zelle aktiviert wird [27]. Die erfolgreiche Ausbildung eines funktionellen BZR ist essentiell für die Entwicklung, die Reifung und das Überleben einer B-Zelle [28] und umfasst einzigartige molekulargenetische Prozesse, wie die Erzeugung der BZR-Diversität (1.2.3.2). Bei der späteren antigen-abhängigen Differenzierung der B-Zelle kommen die Mechanismen der somatischen Hypermutation und des Ig-Klassenwechsel zum Tragen (1.2.3.4).

### 1.2.3.2 Erzeugung der Antigenrezeptordiversität durch V(D)J-Rekombination während der frühen B-Zell-Entwicklung

Die Differenzierung lymphoider Vorläuferzellen zu B-Zellen hängt wesentlich von bestimmten Transkriptionsfaktoren, beispielsweise dem *early B cell factor* (EBF), E2A und BSAP/pax5 ab [29]. Bereits während der ersten Differenzierungsschritte werden durch die Aktivität der Enzyme RAG-1 und RAG-2 (Produkte der *recombination activating genes*) bestimmte Regionen der antikörperkodierenden Gene auf somatischer Ebene rearrangiert (Abb. 2), wodurch grundlegend die Diversität der Antigenrezeptoren erzeugt wird. Dies betrifft bei B-Zellen die V-, D- und J-Segmente der schweren bzw. V- und J-Segmente der leichten Antikörperketten. Die Rekombinationsprozesse bis zur Entstehung eines funktionellen (IgM-) BZR, dem Produkt erfolgreicher V(D)J-Rekombination, verlaufen schrittweise (Abb. 2) und werden durch Phasen der Zellproliferation und Selektion anhand der Funktionalität des BZR-Genrearrangements unterbrochen [30]. Beim nachfolgenden *receptor editing* vermitteln die terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) und andere Nukleasen die weitergehende Diversifizierung des BZR-Repertoires durch den Einbau bzw. die Deletion einzelner Nukleotide [31]. Als Ergebnis entsteht ein Reservoir reifer, naiver B-Zellen mit einem stark diversifizierten Antigenrezeptorrepertoire. Dieses Differenzierungsstadium ist durch die Expression von IgD charakterisiert, welches durch alternatives Spleißen des IgM-BZR-Transkripts hervorgeht.

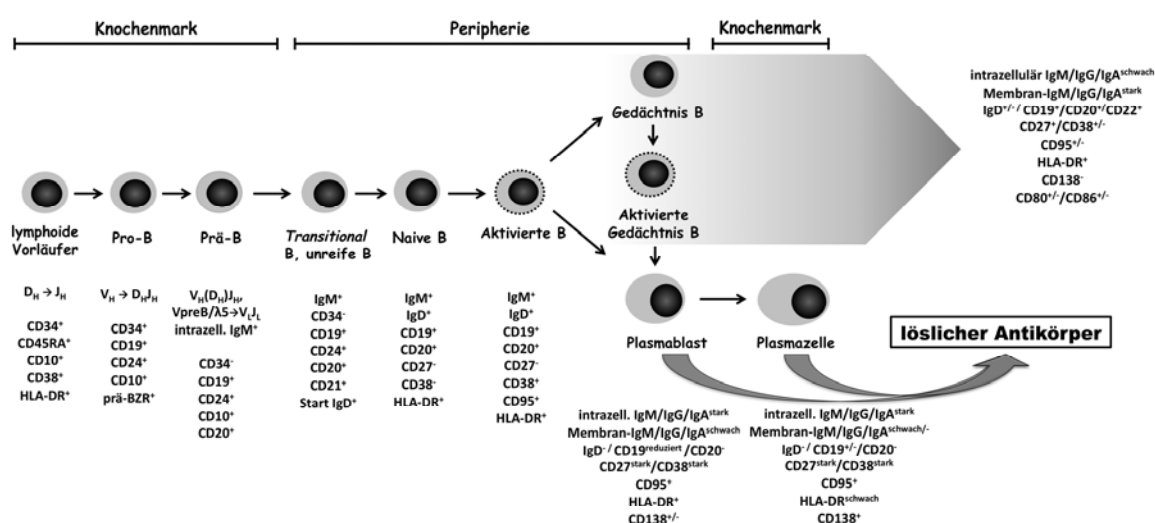


Abb. 2: Chronologische Abfolge und Charakteristika der B-Zell-Differenzierungsstadien [13, 32, 33].

### 1.2.3.3 Plasmazellen als Ergebnis peripherer, antigenabhängiger B-Zell-Differenzierung bei adaptiven Immunantworten

Reife, naive BZ<sup>R</sup> B-Zellen zirkulieren durch das Blut und die Lymphorgane und können durch Antigenbindung aktiviert werden und zu Gedächtnis-B-Zellen oder zu antikörpersezernierenden Plasmazellen differenzieren [34, 35]. Der Standarddifferenzierungsweg aktivierter B-Zellen führt zur Bildung von Plasmazellen, während die Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen sehr spezifischer, u. a. kostimulatorischer Signale von T-Zellen bedarf.

Die Differenzierung zu Plasmazellen kann in sogenannten Keimzentren bzw. Lymphfollikeln oder extrafollikulär stattfinden [36, 37]. Dabei wird ein spezifisches molekulares Entwicklungsprogramm ausgeführt, welches primär vom Verlust des Transkriptionsfaktors *B-cell lineage specific activator protein* (BSAP, kodiert durch *paired box 5*-Gen, *pax5* [38, 39], der Expression von *B lymphocyte induced maturation protein 1* (Blimp-1, [40-42]) und *X box binding protein 1* (XBP-1, [43-45]) sowie der Beendigung der *B cell lymphoma 6 protein* (Bcl-6)-Expression [46, 47] geprägt ist. Dabei werden typische Moleküle und Funktionen von B-Zellen wie Antigenpräsentation, somatische Hypermutation, Ig-Klassenwechsel und Proliferation unterdrückt [41, 48-51], Komponenten des Proteinsyntheseapparates [43, 44] und der *unfolded protein response* (UPR) hingegen verstärkt exprimiert [49, 52, 53].

Dieser Differenzierungsprozess beginnt in den sekundären lymphatischen Geweben. Als Ergebnis der B-Zell-Aktivierung entstehen dort proliferierende, antikörpersezernierende Zellen, sogenannte Plasmablasten. Diese setzen ihre Differenzierung fort, während sie aus den lymphatischen Geweben über das Blut in die Plasmazelldepots des Knochenmarks oder der Lamina propria einwandern und dort schließlich als ausdifferenzierte, nicht proliferierende und sesshafte Plasmazellen vorliegen.

Die Plasmazelldifferenzierung wird ferner von einer Reihe nicht antigenischer Faktoren beeinflusst, u. a. der Interaktion zwischen CD70 und CD27 [54, 55] und kostimulatorischen Signalen von T-Zellen; CD40L [34, 56], Interleukin (IL)-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-15, IL-21, OX40L, Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und *B cell activating factor* (BAFF) [56-60]. Außerdem sind verschiedene Transkriptionsfaktoren, u. a. IRF4, NFATc1, NFATc2, Oct-1, -2, -B in die Plasmazelldifferenzierung involviert, wobei deren genaue Rolle noch zu klären ist [61].

#### 1.2.3.4 Keimzentrumsreaktion, Affinitätsreifung und Ig-Klassenwechsel

B-Zellen, die in Keimzentren zu Plasmablasten differenzieren [62, 63], durchlaufen charakteristische molekulargenetische Anpassungsprozesse – die somatische Hypermutation und den Ig-Klassenwechsel. Keimzentren entstehen in sekundären lymphatischen Organen (z. B. in der Milz, in Lymphknoten und Peyer'schen Plaques) und sind eine mikroanatomische Struktur, die v. a. aus B- und T-Lymphozyten und follikulären dendritischen Zellen besteht. Sie werden im Rahmen adaptiver Immunreaktionen transient induziert. Die beteiligten Zellen durchlaufen komplexe Differenzierungsprozesse, während derer die B-Zellen abwechselnd in ihren variablen Antikörpergenregionen somatische Punktmutationen ( $1 \text{ Mutation}/10^3 \text{ Basenpaare}$  je Zellteilung) akquirieren, sehr stark proliferieren und in Abhängigkeit von der resultierenden Antigenaffinität des exprimierten, mutierten BZR selektioniert werden. Im Keimzentrum sterben daher sehr viele B-Zellen (durch Apoptose) [36, 64-66]. Als Ergebnis dieser Affinitätsreifung [67] entstehen B-Zellen, deren Antigenbindungsverhalten optimiert wurde [68]. Selektionsprozesse hinsichtlich der Antigenaffinität finden in geringerem Maße auch vor und nach der Keimzentrumsreaktion statt [69-71]. Somatische Hypermutation kann prinzipiell auch außerhalb der Keimzentren stattfinden [72, 73].

Der Ig-Klassenwechsel (*class switch recombination*, CSR) findet regulär gleichzeitig mit der somatischen Hypermutation im Keimzentrum statt [74, 75] und ist eine Umordnung der Immunglobulingene, die durch Antigenbindung und T-Zell-Kostimulation in reifen B-Zellen induziert wird und in ihrer qualitativen Ausprägung zytokingesteuert ist [75, 76]. Dabei werden die Gensegmente der schweren Ketten des Antikörpermoleküls solchermaßen rekombiniert, dass anstelle von IgM die Antikörperklassen IgA, IgG oder IgE (seltener auch nur-IgM<sup>+</sup> oder nur-IgD<sup>+</sup>) unter Beibehaltung der Antigenpezifität exprimiert werden. Die veränderte konstante Region des Antikörpermoleküls beeinflusst das Spektrum möglicher Effektormechanismen des Antikörpers, hat aber nur geringen Einfluss auf die Bindung des Antigens.

### *1.2.3.5 Die Rolle von B-Zellen bei der Autoimmunität und ihre Depletion durch die B-Zell-gerichtete Therapie mit Rituximab*

Intensive Proliferation und erhöhte Apoptose während der B-Zell-Entwicklung und Diversifizierung des BZR-Repertoires begünstigen die Bildung autoreaktiver, aber auch maligner B-Zellen, mit eindeutiger Spezifität oder Kreuzreaktivität für körpereigene (Auto-) Antigene. Kommt es zu einem Toleranzbruch bei fehlender Negativselektion, werden B-Zellen durch die immerwährende Präsenz des Autoantigens chronisch aktiviert und sezernieren als ausdifferenzierte, autoreaktive Plasmazellen Autoantikörper. Damit können sie signifikant zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beitragen. Die genauen Ursachen von Autoimmunität sind unklar, wobei genetische Prädispositionen, Umweltfaktoren (z. B. UV-Strahlung, Ernährung, Rauchen) und bestimmte Infektionen beteiligt sein können. Zudem wird eine hormonelle Beteiligung diskutiert, da überwiegend Frauen z. B. an systemischem Lupus erythematodes (SLE), dem Sjögren-Syndrom oder der rheumatoiden Arthritis erkranken (RA). Dabei finden im Immunsystem der Erkrankten auf vielen Ebenen der angeborenen und adaptiven Immunität Fehlregulationen statt, die mit funktionellen Veränderungen von Lymphozyten, Phagozyten sowie von humoralen Komponenten einhergehen. B-Zellen können v. a. durch die Produktion von Autoantikörpern, aber auch durch veränderte Zytokinsekretion und die Präsentation von Autoantigenen zur Autoimmunität beitragen. Bei einem signifikanten Teil autoimmuner Patienten sind pathogene Autoantikörper (vor allem IgG und IgM, auch IgA) und entsprechende Plasmazellen nachweisbar, die i) im Rahmen chronischer Immunantworten entstehen, ii) hochaffine, klassengewechselte BZR mit mutierten variablen Genregionen exprimieren und iii) im zellulären Immungedächtnis verankert sein können [77, 78].

Auf Ebene der B-Zellen wurden eine gestörte Selektion und Toleranzinduktion sowie Apoptosedefekte, mithin die nicht regelrechte Kontrolle von B-Zell-Aktivierung, beschrieben und mit dem Auftreten von Autoimmunität in Zusammenhang gebracht.

Die häufig überlappende Symptomatik bei Autoimmunität wird von der Art der Autoantigene bzw. Autoantikörper bestimmt. Autoantikörper-Erkrankungs-Assoziationen bestehen beispielsweise zwischen

- Anti-dsDNA-Antikörpern (und anderen antinukleären Antikörpern) und der Lupusnephritis,

- Anti-Ro/SS-A und Anti-La/SS-B und SLE und dem Sjögren-Syndrom,
- Antikörpern gegen Gerinnungsfaktoren (beispielsweise Faktor VIII) und Glykoproteine der Thrombozyten (Glykoprotein IIb/IIIa) und der Thrombozytopenie und Hämophilie,
- Antikörpern gegen Transglutaminase und autoimmunem Diabetes sowie
- Antikörpern gegen die Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle der Desmogleine und entzündlichen Hautveränderungen bzw. Pemphigus vulgaris
- Antikörpern gegen Fc-Rezeptoren (Rheumafaktor) und zyklische citrullinierte Peptide und der rheumatoiden Arthritis [79].

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Autoimmunerkrankung, die vor allem die Gelenke betrifft. Autoreaktive Immunreaktionen bewirken die Zerstörung von Synovialgewebe durch dessen chronische Entzündung (Synovitis) und somit den fortschreitenden Funktionsverlust der Gelenke [80]. Dies geht mit Schmerzen und erheblicher Einschränkung der Lebensqualität einher. Die RA betrifft  $\geq 0,5\%$  der Bevölkerung [81] und verursacht hohe Kosten [82]. Bei der Behandlung der RA ist die Effektivität konventioneller Therapien (DMARDs und Zytostatika) begrenzt und mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Dies führte zur Entwicklung moderner Therapieansätze mit Biologika, u. a. zur Blockade von T-Zell/B-Zell-Kostimulation [83] und Zytokinen [84]: IL-6 [85, 86], IL-1 [87-89], TNF- $\alpha$  [90, 91].

Immunsuppressive Standardtherapien mit Proliferationshemmern oder Steroiden sowie die Anti-Zytokin- oder Anti-Kostimulation-Therapien wirken direkt und indirekt (z. B. über die T-Zellen) auf B-Zellen und dämpfen deren Aktivierung vor allem durch die Einschränkung der Zellteilung und -differenzierung und die Unterdrückung der Entzündung [84, 92]. Demgegenüber bewirkt die Behandlung der RA mit dem monoklonalen chimären Anti-CD20-Antikörper Rituximab [93] eine signifikante klinische Besserung für mindestens 6 Monate [94-97] durch die umfassende Depletion der B-Zellen aus dem Organismus. Die Behandlung mit RTX führt auch zum Abklingen der Entzündung und der Gewebsdestruktion der Synovialmembranen [98]. Bei den meisten autoimmunen Patienten konnte eine deutliche Reduktion von Autoantikörpern im Blutserum festgestellt werden, jedoch kein signifikantes Abfallen der protektiven Antikörpertiter [99, 100]. In Übereinstimmung damit ist belegt, dass CD20-negative Plasmazellen im Gewebe in nicht nennenswertem Maße depletiert

werden [101, 102]. Insgesamt verdeutlicht die Wirksamkeit dieser und anderer B-Zell-gerichteter Therapien bei der RA [103, 104], dass B-Zellen, im Gegensatz zu früheren Sichtweisen [105], bei der Pathogenese die RA eine fundamentale Rolle spielen.

Rituximab bindet das CD20-Molekül, welches nur auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert wird und verursacht den Tod der B-Zelle durch verschiedene Mechanismen, vor allem durch antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität [106, 107]. Das Medikament stammt ursprünglich aus der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen [108], wo es zur Entfernung der malignen, häufig CD20 exprimierenden Lymphomzellen genutzt wird.

Im Verlauf der B-Zell-Entwicklung beginnt die Expression von CD20 im Prä-B-Zell-Stadium. Sie endet erst während der abschließenden Differenzierung zur Plasmazelle (Abb. 2) [109], sodass bei Plasmablasten und Plasmazellen in menschlichem Blut und Knochenmark keine CD20-kodierende mRNA mehr nachgewiesen wurde (Yoshida, Mei, Wondossen et al., Manuskript in Vorbereitung).

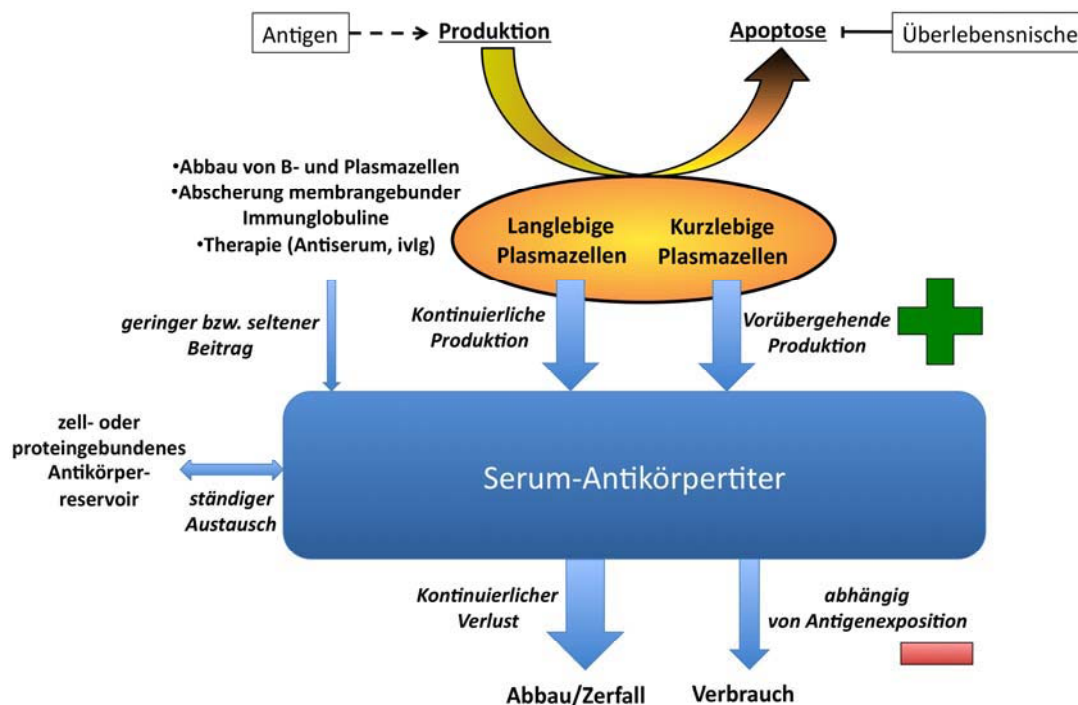
Die Analyse von Plasmazellen und Plasmablasten unter der B-Zell-Depletion mit Rituximab erlaubt daher Einblicke in die Abhängigkeit der Homöostase und Regulation dieser Zellen von CD20<sup>+</sup> naiven Gedächtnis-B-Zellen *in vivo*. Darüber hinaus ist von Interesse, ob und inwiefern Plasmablasten und Plasmazellen während der Rituximab-Therapie mit klinischem Ansprechen bzw. Therapieversagen in Zusammenhang stehen.

### **1.3 Die Kontrolle des humoralen Gedächtnisses durch die Plasmazellhomöostase**

Das humorale Immungedächtnis widerspiegelt sich in der Persistenz antigenspezifischer Serumantikörperspiegel vom IgG-Isotyp. Antikörper werden ausschließlich von Plasmablasten und Plasmazellen gebildet und in großer Menge ausgeschüttet. Ihre physische Halbwertszeit beträgt etwa 3 Wochen [110-112], die Halbwertszeit der spezifischer Antikörper im Blutserum jedoch > 10 Jahre [113, 114] wenn sie im Rahmen T-Zell-abhängiger Immunantworten induziert wurden. Das bedeutet, dass die strukturelle Integrität einmal sezernierter Immunglobuline nicht zum humoralen Gedächtnis beiträgt. Die Aufrechterhaltung und Regulation des



humoralen Gedächtnisses findet stattdessen auf der Ebene antikörpersezernierender Plasmablasten und Plasmazellen bzw. deren Vorläufer und ihrer Umgebung statt (Abb. 3, 4).

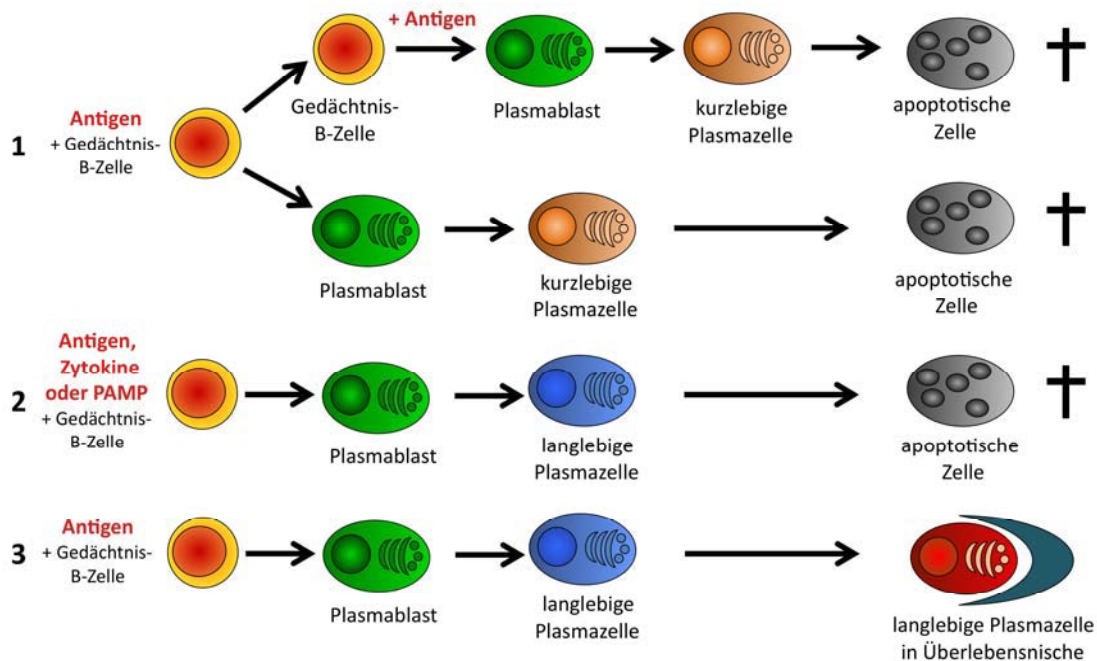


**Abb. 3: Bilanzschema für spezifische Serumantikörperkonzentrationen.**

Die Einflüsse auf die Konzentrationen spezifischer Serumimmunglobuline sind illustriert. Deren Stabilität bedingt die ständige Antikörpersekretion durch Plasmablasten und Plasmazellen bei kontinuierlicher Degradation der Antikörpermoleküle. Die Bereitstellung von Antikörpern durch Plasmablasten und Plasmazellen hängt von ihrer Anzahl (Produktion versus Apoptose) und der Antikörpersekretionsrate ab.

Die Anzahl aller Plasmazellen für eine gegebene Spezifität muss bei gleichbleibender und individuell vergleichbarer Antikörpersekretion etwa konstant bleiben, um die Stabilität der spezifischen Antikörpertiter zu gewährleisten (Abb. 3). Dies kann entweder durch das langfristige Überdauern individueller Plasmazellen („Langlebigkeit“) oder durch ein Gleichgewicht zwischen der kontinuierlichen Produktion und dem Absterben von Plasmazellen oder durch eine Kombination von beidem bewirkt werden. Beides, sowohl die Langlebigkeit als auch die kontinuierliche Nachproduktion von Plasmazellen wurden als Mechanismen der Aufrechterhaltung humoralen Immungedächtnisses postuliert [5, 6, 56, 115, 116], wobei bei letzterer zwischen dem Konzept der polyklonalen *toll-like*-Rezeptor-vermittelten *Bystander*-Aktivierung langlebiger Gedächtnis-B-Zellen durch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) [56] und der Persistenz von Antigen auf bzw. in

antigenpräsentierenden Zellen (follikulären dendritischen Zellen) [115, 117, 118] unterschieden wird (Abb. 4). Letzteres Konzept beruht, im Gegensatz zu den beiden anderen Ansätzen, nicht zwingend auf der Existenz eines zellulären Immungedächtnisses. Die kontinuierliche Nachproduktion von Plasmazellen stünde im Einklang mit der Idee der kontrollierten homöostatischen Proliferation von Plasmazellen zur Aufrechterhaltung spezifischer Serumantikörpertiter.



**Abb. 4: Mechanismen zur Aufrechterhaltung spezifischer Serumimmunglobulintiter.**

Das erste Konzept beruht vor allem auf dem Überdauern antigenischer Stimuli in einem Organismus. Diese Antigene würden kontinuierlich spezifische Immunantworten geringen Ausmaßes induzieren, bei denen kurzlebige Plasmazellen gebildet werden. Die Grundlage der anderen beiden Konzepte ist die Funktion von Gedächtnis-B- und langlebigen Plasmazellen. Bei Modell 2 wird eine Halbwertszeit „langlebiger“ Plasmazellen im Bereich einiger Wochen angenommen [119]. Bei Modell 3 kann die Lebensspanne einer Plasmazelle in Abhängigkeit von ihrem Aufenthalt in einer hypothetischen Überlebensnische bis zu der des Individuums betragen (adaptiert und modifiziert nach [120]).

Die Antikörpersekretion durch Plasmazellen im Knochenmark ist antigenunabhängig [121]. Die Blockierung der Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen durch Bestrahlung, Gabe von Zytostatika oder B-Zell-Depletion ließ ebenfalls den Schluss auf die Existenz langlebiger Plasmazellen zu [5, 120, 122, 123]. Ferner blieben antigenspezifische Plasmazellen nach der Entfernung von Gedächtnis-B-Zellen aus dem Organismus in unveränderten Frequenzen erhalten [124]. Beim Menschen wird die (therapeutische) Depletion von naiven B-Zellen und von Gedächtnis-B-Zellen

durch den monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab erreicht. Sie interferiert nicht mit der Stabilität protektiver IgG-Antikörpertiter [99, 100] oder der Frequenz reifer CD138<sup>+</sup> Plasmazellen im Knochenmark (Brisslert et al., Manuskript eingereicht).

Dies alles deutet auf die Anwesenheit langlebiger Plasmazellen im Menschen hin, die unabhängig von B-Zelldifferenzierung und Antigenexposition kontinuierlich und über lange Zeit Antikörper sezernieren und so das humorale Gedächtnis ausprägen. In der Vergangenheit wurde diskutiert, inwiefern dies im Sinne der Immunprotektion ausreichend ist und ggf. durch Immunstimulation mittels gespeichertem Antigen supplementiert wird [115, 125]. Diese Mechanismen könnten analog zur Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu (langlebigen) Plasmazellen bei wiederholtem Antigenkontakt als *back-up*-Strategie für die Aufrechterhaltung von Antikörpertitern sowie verbesserter Antigenadaption dienen.

Gleichwohl hängen das humorale Gedächtnis und seine Regulation von der Homöostase der Plasmablasten und Plasmazellen ab (Abb. 3), und zwar von

- i) ihrer Anzahl, bestimmt durch ihre Produktion im Rahmen von Immunereignissen mit B-Zellaktivierung sowie Apoptose,
- ii) ihrer Lebensspanne, die intrinsisch durch die Umstände ihrer Aktivierung und extrinsisch durch die begrenzte Verfügbarkeit von löslichen und nicht löslichen Überlebenssignalen bestimmt sein kann, und
- iii) ihren funktionellen Eigenschaften, wie der Affinität und des Isotyps der sezernierten Antikörper und ihrer durch ihren Aufenthaltsort im Körper und in Mikroumgebungen mitbestimmten Kompetenz zur Gedächtnisausprägung.

### 1.3.1 Produktion von Plasmazellen und Antikörpersekretion

Plasmazellen bzw. spezifische Antikörper wurden erstmals 1890 durch Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato unbewusst als Vermittler humoraler Immunität dargestellt. Damals wurde spezifische Immunität durch Serumantikörper von einem Individuum auf das andere übertragen [1]. 1948 wurden Plasmazellen als Zellen mit auffällig vergrößertem Zytoplasma in der Kaninchenmilz identifiziert und als solche bezeichnet (A. Fagraeus). 1955 wurden Antikörper in Plasmazellen und 1959 deren Sekretion durch Plasmazellen nachgewiesen [126]. Nach einer Immunisierung

entstehen Plasmazellen in sekundären lymphatischen Organen. Sie existieren dort einige Tage bis hin zu Wochen, wonach die meisten wieder verschwinden. Nur etwa 10 % sind dort nach 6 Monaten noch nachweisbar [37, 127]. Zum Zeitpunkt des Verschwindens aus den sekundären lymphatischen Organen konnte die Akkumulation antigenspezifischer Plasmazellen im Knochenmark beobachtet werden [63, 128, 129], deren Halbwertszeit initial mit  $\leq 3$  Wochen bestimmt wurde [130]. Bis zu 5 Wochen nach der Impfung wandern frische Plasmablasten ins Knochenmark, wo sie ohne Zellteilung überdauern und Antikörper sezernieren [6]. In der Regel sind langlebige Plasmazellen hochaffin für „ihr“ Antigen, Ig-klassengewechselt und stammen aus sekundären Immunreaktionen. Sie können jedoch prinzipiell auch aus primären Immunantworten (und somit von naiven B-Zellen) stammen [131, 132] und entsprechend niedrigere Antigenaffinität besitzen. Der quantitative Beitrag der Differenzierung naiver B-Zellen zum humoralen Gedächtnis bleibt jedoch ungewiss.

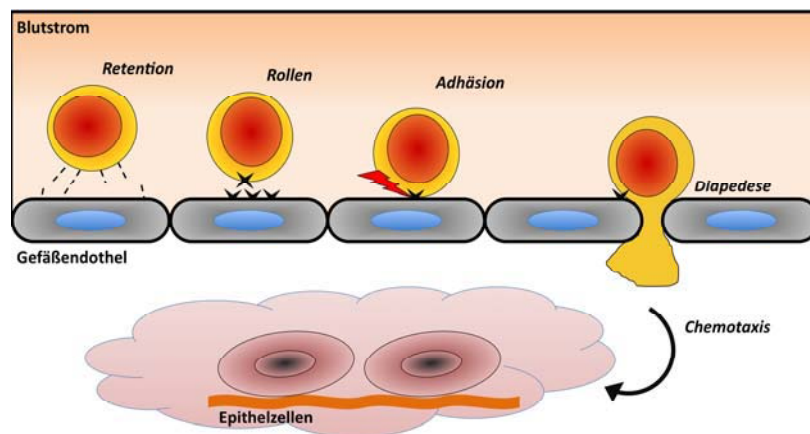
Bereits während der Plasmazelldifferenzierung beginnt die Sekretion von Antikörpermolekülen, die vermutlich bis zum Tod der Plasmazelle aufrechterhalten wird. Die Antikörpersekretion neu generierter Plasmablasten und Plasmazellen lässt sich am Anstieg spezifischen Immunglobulins im Blutserum nach Immunisierung nachvollziehen. Präexistierende Antikörper haben Einfluss auf den Umfang der Plasmablasten- bzw. der Antikörperbildung. Während präexistierendes antigenspezifisches IgM eine B-Zell-Antwort auf genau dieses Antigen verstärkt, wirken antigenspezifische IgG-Antikörper inhibierend [18, 19]. Dabei findet die IgM-vermittelte Verstärkung durch Komplement und Komplementrezeptoren auf B-Zellen und dendritischen Zellen statt. Die IgG-vermittelte Inhibition erfolgt durch Antigen-Antikörperkomplexe, die via BZR und FcγRIIB an B-Zellen binden und BZR-Signaltransduktion hemmen [133, 134]. Wird eine B-Zell-Antwort durch ein Proteinantigen induziert, steigt die Antikörperkonzentration im Blutserum bis etwa zwei Wochen nach Immunisierung an und fällt danach wieder ab, um auf einem konstanten Niveau zu verbleiben. Vorausgesetzt, die Halbwertszeit der sezernierten Immunglobuline und die Sekretionsraten der zugrundeliegenden Plasmazellen sind durchschnittlich vergleichbar, spiegelt dies den Tod der meisten der neu generierten Plasmablasten innerhalb von 2 Wochen nach der Immunisierung wider, während eine Subfraktion zu langlebigen Plasmazellen differenziert und langfristig Antikörper bilden kann (Abb. 4).

### 1.3.2 Überleben und Apoptose von Plasmazellen

*Ex vivo* isolierte Plasmazellen sterben *in vitro* ohne den Zusatz spezieller Überlebensfaktoren innerhalb eines Tages (Yoshida et al., unveröffentlicht), können aber durch eine Reihe synergetisch wirkender Faktoren für eine begrenzte Zeit vital bleiben. *In vivo* hängt ihr Überleben von der Wechselwirkung mit den Faktoren bzw. Zellen einer hypothetischen Überlebensnische ab, die Plasmazellen mit Überlebensfaktoren und -signalen versorgt [120, 135]. Langfristig überlebende Plasmazellen lagern u. a. im Knochenmark, teilen sich nicht und sind resistent gegenüber Radioaktivität, Immunsuppression und B-Zell-Depletion [120, 122-124]. Die Zusammensetzung dieser Nische ist weitgehend unbekannt, es gibt jedoch Hinweise auf die beteiligten Zellen und Faktoren. So können beispielsweise Stromazellen Plasmazellen durch die Bereitstellung von CXCL12, *a proliferation inducing ligand* (APRIL) und IL-6 am Leben erhalten [136-138]. Bislang ist unklar, ob die Überlebensnische statisch ist oder ob Plasmazellen möglicherweise durch verschiedenartige Nischen wandern und versorgt werden, die (eventuell nur) in ihrer örtlichen und zeitlichen Abfolge ein langfristiges Überleben einer Plasmazelle ermöglichen. Histologisch wurde im Knochenmark die Nähe von Plasmazellen zu CXCL12<sup>+</sup> Fibroblasten belegt, wo sie u. a. mit Pro-B-Zellen kolokalisieren [139]. IL-6 und CXCL12 wurden zwar als Überlebensfaktoren *in vitro* identifiziert [140], beide sind jedoch weder hinreichend noch *in vivo* essentiell. CXCL12 ist jedoch unabdingbar für die regelrechte Mikrolokalisation der Plasmazellen im Gewebe, die ihrerseits wiederum nicht essentiell für ihre Funktion zu sein scheint. Der Tod von Plasmazellen unter Normalbedingungen wird wahrscheinlich durch den Entzug an Überlebensfaktoren verursacht. Der endoplasmatische Stress kann dann nicht mehr ausgeglichen werden und die Zellen werden apoptotisch und sterben [141]. Die Dislozierung von Plasmazellen aus ihrer lebenserhaltenden Mikroumgebung führt dementsprechend sehr wahrscheinlich zu ihrem Tod. Plasmazellen können auch durch FcγRIIB-Quervernetzung mittels IgG sterben [142]. Die Anzahl der überlebenden Plasmazellen wird durch die Nische limitiert.

### 1.3.3 Herkunft und Migrationsziel zirkulierender Plasmazellen

Plasmablasten werden regulär in den sekundären lymphatischen Geweben generiert. Einige Plasmablasten verlassen diese Gewebe in den Blutkreislauf und können ihrer Ausrüstung mit Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen gemäß spezifisch in andere Immungewebe einwandern (Abb. 5) [143]. Da die Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen während der Plasmazelldifferenzierung u. a. von den Faktoren des umliegenden Gewebes gesteuert wird (z. B. [144]), erfolgt keine gleichförmige Verteilung der Plasmablasten aus einer einzelnen Immunreaktion über die Immungewebe. Zirkulierende Plasmablasten gehorchen vielmehr dem Konzept der gewebsspezifischen Lymphozytenwanderung [145], sodass die höchste Frequenz antigenspezifischer Plasmazellen in demjenigen Organ nachgewiesen werden kann, in dem ihre Induktion stattgefunden hat [146, 147]. Nicht in das Blut abgegebene Plasmablasten überleben höchstens einige Wochen, bevor sie *in situ* absterben. Das Zustandekommen einer Immunreaktion (insbesondere einer Keimzentrumsreaktion), bei der Plasmablasten gebildet werden, ist ebenfalls mit der koordinierten Funktion von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen auf B- und T-Lymphozyten verbunden, die hier nicht im Detail betrachtet werden.



**Abb. 5: Die Phasen des Transmigrationsprozesses von Leukozyten durch das Gefäßendothel.**

Anfänglich wird der Leukozyt im Blutstrom durch transiente Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen der Zellen (Integrine und Selektine) und des Endothels verlangsamt, sodass die Aktivierung von Integrinen und die Aktivierung von Chemotaxissignalen durch Bindung von Chemokinen stattfinden kann. Daraufhin werden in der Zelle Adhäsionsmoleküle spezifisch aktiviert, sodass eine feste Bindung der Zelle an die endotheliale Oberfläche entsteht und die Zelle schließlich durch das Endothel tritt. Subendothelial bewirkt die Bindung meist löslicher Chemokine die Chemotaxis der Zellen in eine bestimmte Mikroumgebung, hin zur höheren Konzentration des Chemokins, das beispielsweise von Epithelzellen, aber auch stromalen Fibroblasten und Leukozyten gebildet werden kann. Die Abbildung basiert auf [143, 148, 149].

Die Gewebeumgebung während des Antigenkontakts entscheidet darüber, ob eine systemische oder lokale ggf. mukosale Immunreaktion erfolgt oder eine Überlappung beider. Antigene, die sich in der Zirkulation befinden, induzieren vor allem systemische Immunreaktionen in der Milz und in peripheren Lymphknoten und resultieren in der Produktion von IgG<sup>+</sup> Plasmablasten, die später als ausdifferenzierte Plasmazellen vor allem im Knochenmark zu finden sind. Antigenexposition an der Haut und an Schleimhäuten führt, sofern nicht toleriert, zur Induktion einer lokalen Immunantwort in den Tonsillen bzw. im Waldeyer-Ring, in den Peyer'schen Plaques, *milky spots* im Omentum [150] und mesenterialen Lymphknoten des Darmgewebes und resultiert in der Produktion von IgA<sup>+</sup> Plasmablasten, die präferentiell in mukosale Gewebe einwandern, z. B. in die Lamina propria. Dort stellen IgA<sup>+</sup> Plasmazellen die dominante Plasmazellfraktion dar und sezernieren vor allem für die Sekretion bestimmte IgA-Polymere (1.2.3.1).

Die Plasmazelldifferenzierung bewirkt drastische Veränderungen im Navigationsverhalten der Zellen. 6 Tage nach Immunisierung wandern Plasmablasten in Milz und Knochenmark gegen CXCR3 und CXCR4-Liganden [129], aber nicht mehr gegen die CCR7 Liganden CCL19, CCL21, und CXCL13, die sie in den sekundären lymphatischen Organen zurückhalten würden [151]. Abgesehen von der postulierten *in situ* Differenzierung von Plasmazellen [15] sind Plasmablasten aus mukosalen und systemischen Immunreaktionen etwa eine Woche nach deren Induktion im peripheren Blut vorübergehend nachweisbar [152-154]. Von dort aus wandern sie in Plasmazelldepots, vor allem in das Knochenmark oder die Lamina propria bzw. in entzündete Gewebe. Der Aufenthaltsort ist für Plasmazellen offenbar auch insbesondere hinsichtlich der Gedächtnisfunktion wichtig. Im Knochenmark wurde die Hauptfraktion langlebiger IgG<sup>+</sup> Plasmazellen identifiziert, wobei diese auch in der Milz oder entzündeten Geweben lagern können [5, 6, 122]. Ob und wie Plasmazellen innerhalb mukosaler Gewebe überleben und wie die Homöostase mukosaler Plasmazellen reguliert wird, ist ungewiss [155]. Das Migrationsverhalten von Plasmablasten stellt ein wesentliches Regulativ für die Etablierung des humoralen Gedächtnisses dar, das die Fähigkeit der Plasmablasten, die sekundären lymphatischen Organe zu verlassen und über die Blutzirkulation in das Knochenmark zu gelangen, beinhaltet [156]. Im Blut erscheinen sie als phänotypisches Intermediat zwischen tonsillären Plasmablasten und reifen Knochenmarksplasmazellen [157]. Die reguläre Frequenz der Plasmazellen im Knochenmark und Blut ist niedrig [158,

159] und die Aufnahmekapazität des Knochenmarks für Plasmazellen scheint begrenzt zu sein [120]. Eine Rezirkulation reifer Plasmazellen wurde bisher nicht beschrieben, sodass Plasmazellen im Knochenmark als ausdifferenziert gelten.

Die Induktion und Funktion von Plasmazellen in mukosalen Geweben ist, im Gegensatz zu systemisch (parenteral) induzierten Plasmazellen, mit der Produktion von sekretorischen IgA-Dimeren verknüpft [160-162]. Die gewebsspezifische Zellnavigation IgA-exprimierender Plasmazellen beruht u. a. auf der Funktion von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, CCR10 und CCR9, welche zur Akkumulation IgA-sezernierender Zellen in mukosalen Geweben beitragen und so eine separate Differenzierung gestatten [163].

### 1.3.4 Molekulare Komponenten des gewebsspezifischen Wanderungsverhaltens von Plasmazellen

Die Translokation von Zellen aus dem Blut in ein Gewebe wird im Wesentlichen während des Prozesses der Zellmigration durch das Gefäßendothel reguliert (Abb. 5). An diesem Transmigrationsprozess sowie an der regelrechten Mikrolokalisierung von Plasmazellen im Gewebe sind Adhäsionsmoleküle (Integrine und Selektine) und Chemokine/Chemokinrezeptoren beteiligt. Adhäsionsmoleküle benötigen für ihre Funktion als Vermittler von Zell-Zell oder Zell-Matrix-Kontakten den direkten Kontakt zu ihrem Bindungspartner, während Chemokine löslich sind und Konzentrationsgradienten ausbilden, die auf eine Zelle mit einem entsprechenden Chemokinrezeptor attraktiv wirken. Im Netzwerk der bisher identifizierten Adhäsionsmoleküle und Chemokine dominieren redundante bzw. promiskuitive Bindungsmuster, sodass ein Chemokin oder Adhäsionsmolekül meist mehrere mögliche Rezeptoren hat, die wiederum mehrere Liganden haben können. Die tatsächliche Wechselwirkung wird so eher von der unterschiedlichen Affinität der Ligand-Rezeptor-Paare, von der Expressionsstärke der beteiligten Moleküle und der Dauer ihrer Wechselwirkung gesteuert. Chemokin- und Adhäsionsrezeptoren können aufgrund ihrer Bindung intrazellulär Signale induzieren und ihre Funktionen dadurch wechselseitig beeinflussen. So kann die Funktionalität eines Integrins beispielsweise vom gleichzeitigen Gebrauch eines Chemokinrezeptors bestimmt werden.



#### 1.3.4.1 Adhäsionsmoleküle auf Plasmazellen

Plasmablasten und Plasmazellen können eine Reihe verschiedener Adhäsionsmoleküle exprimieren, von denen hier CD62L (L-Selektin) [157, 162] und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin im Detail dargestellt werden. CD62L [164] ist ein Typ1-Transmembranglykoprotein und bindet sialylierte Karbohydrate in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die Bindungspartner von CD62L werden als *peripheral lymph node addressin* (PNAd) [165] zusammengefasst, wozu *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1* (GlyCAM-1), CD34, *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) und *mucosal addressin cell adhesion molecule-1* (MadCAM-1) zählen [149]. CD62L vermittelt die Retention und *rolling* als Vorbedingung für Zelladhäsion, vor allem in Wechselwirkung mit dem Endothel der Venolen in Lymphknoten. Der genetisch determinierte Funktionsausfall von CD62L verhindert fast vollständig die Zellmigration in Lymphknoten, wobei auch posttranslationale Modifikationen der CD62L-Bindungspartner [166, 167] und die Abscherung von CD62L durch Matrix-Metalloproteinasen beim Transmigrationsprozess eine wichtige Rolle spielen [168, 169]. Beim *rolling* spielen zudem Integrine eine wichtige Rolle (Abb. 5). Ihre Blockade zusätzlich zu der von CD62L behindert die Zellmigration praktisch vollständig [170-172]. Plasmazellen können  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin exprimieren [154, 173, 174]. Der hochaffine Bindungspartner von  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin ist VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und der von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin MadCAM-1. MadCAM-1 [175] wird in Magen-Darm-Trakt-assoziierten mukosalen Geweben exprimiert [175, 176], in den Milchdrüsen und im Marginalsinus der murinen Milz. Die Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin Lymphozyten wird als mit mukosalem Migrationsverhalten assoziiert angesehen [143, 149, 177-179].

IgG<sup>+</sup> Plasmazellen können an VCAM-1 adhären [173], welches u. a. von Stromazellen im Knochenmark exprimiert wird [180, 181]. Die Wechselwirkung zwischen VCAM-1 und  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin könnte daher an der Regulation der Plasmazellhomöostase im Knochenmark beteiligt sein.

### 1.3.4.2 Chemokinrezeptoren auf Plasmazellen

Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren. Sie interagieren mit Chemokinen, welches kleine, basische Peptide sind, die etwa 70 - 125 Aminosäuren umfassen. Wird ein Chemokin durch einen passenden, zellmembranständigen Chemokinrezeptor gebunden, bewirkt die intrazelluläre Signalweiterleitung die räumlich gerichtete Umordnung des Zytoskeletts, wodurch sich die Zelle zielgerichtet bewegt (Chemotaxis).

Chemokine sind löslich, können jedoch durch nichtkovalente Wechselwirkung mit Glukosaminglykanen, beispielsweise auf Endothelzellen, retiniert werden und lokal akkumulieren [182]. Chemokine haben einen lokalen Wirkungsradius, der durch die Reichweite bzw. Wirksamkeit ihrer Mikrogradienten bestimmt wird.

Die essentielle Funktion von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen für die Zellmigration widerspiegelt sich in dem verhinderten Gewebeeintritt von Leukozyten trotz des Stattfindens des regulären *rolling*-Prozesses an der Gefäßwand, wenn die intrazelluläre Signalverarbeitung von Chemokinrezeptoren nach Bindung von Chemokinen blockiert wurde oder Adhäsionsmoleküle ausgeschaltet wurden [183, 184]. Dabei spielt der Chemokingradient keine Rolle, sondern allein die Bindung des Chemokins an den Chemokinrezeptor [185]. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, ob nicht die teilweise sehr starke Integrinexpression bei Plasmazellen die Funktion von Chemokinrezeptoren überbrücken könnte [186].

Die funktionellen Chemokinrezeptoren (und ihre Chemokinliganden) werden anhand der typischen molekularen Anordnung ihrer Cysteinbausteine in CC-, CXC- und CX3C-Chemokine unterteilt.

Homöostatische Chemokine, beispielsweise CXCL12 und CXCL13, vermitteln im immunologischen Gleichgewichtszustand die regelrechte Positionierung von B-Zellen und anderen Immunzellen in den Immungeweben. Die Expression proinflammatorischer Chemokine (beispielsweise CXCL9, CXCL10 und CXCL11) wird lokal unter Entzündungsbedingungen bei verschiedenen Zelltypen z. B. via Interferon (IFN)- $\gamma$  induziert und kann die Effekte der stets vorhandenen homöostatischen Chemokine überbrücken. Solche inflammatorischen Chemokine bewirken u. a. die Akkumulation von Leukozyten, insbesondere auch Plasmazellen in entzündeten Geweben [143, 179].

Die Expression von Chemokinen ist häufig gewebspezifisch. So beschränkt sich beispielsweise die Expression von CCL27 und CCL28 als Liganden von CCR10 auf die Haut und mukosale Gewebe und die von CCL25 als Ligand von CCR9 auf die Immungewebe des Dünndarm. Das für mukosale Gewebe charakteristische Chemokin ist CCL28, welches sowohl in Atemwegs- als auch Magen-Darm-Trakt-assoziiertem Immungewebe exprimiert wird [187] und chemotaktisch auf Plasmablasten wirkt [188-191]. Die spezifische Migration IgA-sezernierender Plasmablasten in das Dünndarmgewebe wird spezifisch durch CCR9 und, mit teils redundanter Funktion, durch CCR10 vermittelt [188, 192, 193]. Daher werden die Wechselwirkungen von CCR9/CCL25 sowie CCR10/CCL28 als charakteristisch für intestinales bzw. mukosales Zellmigrationsverhalten aufgefasst [179, 194].

Hingegen wird das homöostatische Chemokin CXCL12 [195, 196] als Ligand von CXCR4 in vielen lymphoiden Geweben exprimiert [197]. Neben der Funktion von CXCR4/CXCL12 bei der frühen B-Zell-Entwicklung [198, 199] wird CXCR4 auf Plasmablasten und Plasmazellen exprimiert und ist wichtig, aber nicht essentiell für ihre Wanderung ins Knochenmark und ihre Mikrolokalisierung dort und in der Milz [200]. CXCL12 ist hinreichend für die Akkumulation von Plasmazellen, wie durch die genetisch induzierte ektopische Expression von CXCL12 im Pankreas belegt wurde [201]. CXCL12 wird auch in der Mukosa gebildet und attrahiert *in vitro* dort ansässige Plasmazellen in geringer Frequenz.

Die Expression von CXCR3 wird während der Plasmazelldifferenzierung durch inflammatorische Zytokine induziert [144]. Entzündete Gewebe weisen eine erhöhte Expressionen der CXCR3-Liganden, den Chemokinen IP-10, I-TAC und MIG, auf. Folglich akkumulieren CXCR3<sup>+</sup> Plasmazellen in den akuten und chronischen Entzündungsarealen, beispielsweise in autoimmun entzündeten Nieren [202], in welchen proinflammatorische Zytokine produziert werden [78, 202-205].



## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die Regulation des humoralen Gedächtnisses, d. h. antigenspezifischer Antikörperkonzentrationen und der ihnen zugrundeliegenden Plasmazellen, unterliegt einer Vielzahl von Regulationsprozessen des Immunsystems, zum Beispiel stimulierenden exogenen Faktoren (Antigene), deren Qualität und Quantität sowie dem örtlichen und zeitlichen Zusammenhang der Immunaktivierung. Die therapeutische Manipulation dieses Gedächtnisses, d. h. die gezielte und dauerhafte Einführung oder Entfernung von Antigenspezifitäten, ist sowohl bei der Impfstoffentwicklung als auch bei der Behandlung antikörpervermittelter Autoimmunerkrankungen erwünscht, jedoch bisher nicht gelungen. Die Ursache dafür ist u. a. die bisher unzureichend untersuchte und verstandene Homöostase der dem humoralen Gedächtnis zugrundeliegenden antikörpersezernierenden Plasmazellfraktionen. Anzahl und Eigenschaften dieser Zellen bestimmen die Eigenschaften des humoralen Gedächtnisses, dessen Zusammensetzung und Spezifität sowie dessen Dauer bzw. Halbwertszeit. Daher wurde die Homöostase menschlicher Plasmazellen und ihrer unmittelbaren Vorläuferzellen, der ebenfalls antikörpersezernierenden Plasmablasten, zum Gegenstand der Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählt. In diesem Zusammenhang wurden die Anzahl und Eigenschaften von Plasmablasten und Plasmazellen in Blut und Knochenmark experimentell analysiert. Dabei wurde im Vergleich zum immunologischen Ruhezustand insbesondere der Einfluss

- einer (gedächtnisinduzierenden) sekundären systemischen Immunantwort nach Tetanusimmunisierung,
- von Splenektomie und
- therapeutischer B-Zell-Depletion (bei RA-Patienten)

untersucht. Die Ergebnisse werden hinsichtlich der Ausbildung und Aufrechterhaltung des humoralen Gedächtnisses (Abb. 4) betrachtet.



### 3 Probanden, Material und Methoden

#### 3.1 Gesunde Probanden und Patienten

Gesunde Probanden waren Männer und Frauen (18 - 65 Jahre) ohne bekannte gesundheitliche Einschränkungen. Sie wurden als gesund erachtet, wenn sie selber angaben, nicht an einer das Immunsystem betreffenden Erkrankung zu leiden, und zur Zeit der Blutanalyse bzw. unmittelbar vorher keine Symptome einer akuten Infektion aufwiesen. Probanden, von denen Knochenmarkzellen analysiert wurden, waren 55 - 80, durchschnittlich 68 Jahre alt.

Ein Teil der Blutproben wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach regulären Auffrischungsimpfungen mit Tetanus-Diphtherie (TD)-Impfstoff (20 internationale Einheiten, I. E., Aventis-Pasteur MSD, Leimen, Deutschland) gewonnen. Die vorangegangene Tetanustoxoid (TT)-Auffrischungsimpfung lag bei allen Probanden mindestens 7 Jahre zurück. Tetanusimmunisierungen werden seit 1920 von der ständigen Impfkommision des Robert-Koch-Instituts (STIKO) empfohlen und routinemäßig bereits im Säuglingsalter durchgeführt (4 Dosen im ersten Lebensjahr). Im Jugendalter sollte im Abstand von < 5 Jahren nachgeimpft werden, bei Erwachsenen alle 10 Jahre [206]. Folglich stellte die hier untersuchte Auffrischungsimpfung die insgesamt etwa 8. bis 12. Tetanusimpfung der Probanden dar. Die Impfung wurde von allen Probanden gut vertragen und es konnten keine unüblichen Impfreaktionen festgestellt werden.

Im Rahmen einer klinischen Studie wurden Blutproben von Patienten mit RA vor und unter B-Zell-depletierender Anti-CD20-Therapie mit Rituximab (RTX, MabThera®, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) untersucht. Die Patienten hatten vor der Rituximab-Behandlung keine klinische Besserung nach Einleitung mindestens eines Anti-TNF- $\alpha$  Therapiezyklus gezeigt. Begleitende klinische und serologische Daten wurden im Rahmen der FIRST-Studie erhoben. Rituximab wurde in 2 Dosen zu je 1 g intravenös im Abstand von 2 Wochen verabreicht. Darüber hinaus wurde das Blut einiger Patienten unter einer erneuten Rituximab-Behandlung analysiert (2. Kurs). Die Krankheitsaktivität wurde durch den DAS28-Index [207, 208] bestimmt und klinisches Ansprechen auf die Rituximab-Behandlung wurde gemäß den EULAR (*European League Against Rheumatism*)-Kriterien einer Reduktion des DAS28-Index

um mindestens 1,2 Indexpunkte bzw. um  $> 0,6$  Indexpunkte gleichgesetzt, wenn die RA-Aktivität unter dem DAS28-Wert von 5,1 lag. Zum Vergleich wurden Blutproben von 4 splenektomierten Patienten (33 - 79, durchschnittlich 56 Jahre,  $> 2$  Jahre nach Splenektomie) mit chronischer Autoimmunthrombozytopenie (AITP) analysiert.

Weiterhin wurde Knochenmark aus Operationspräparaten gewonnen, die im Rahmen von Totalendoprothesen des Hüftgelenks (Hüft-TEPs) bei Patienten mit Coxarthrose-Erkrankungen anfielen. Dieses normalerweise verworfene Material stand hier im Rahmen einer Kooperation mit der Klinik für Orthopädie (Dr. Kathi Thiele, Dr. Georg Matsiolis und Prof. Carsten Perka, Charité Campus Mitte) für Experimente zur Verfügung.

Alle Blutspenden waren freiwillig und die Erlaubnis zur Entnahme wurde stets erteilt. Die Ethikkommission der Charité hat diesen Projekten zugestimmt, die konform mit der Deklaration von Helsinki sind.

### 3.2 Probenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen aus menschlichen Blut- und Knochenmarkproben untersucht. Durch Punktion der Armbeugenvenen (*Vena mediana cubiti*, *Vena basilica* oder *Vena cephalica*) wurden 5 bis 120 ml Vollblut entnommen. Das Blut wurde in mit Antikoagulanzen präparierten Röhrchen (BD, Heidelberg, Deutschland und Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gewonnen. Als Gerinnungshemmer wurden Dikalium-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Endkonzentration 1,8 mg/ml), Heparin (Endkonzentration 17 I. E./ml) oder Natriumcitratlösung (0,105 M im Volumenverhältnis Blut : Citratlösung = 9 : 1) verwendet.

Blutserum wurde durch kommerzielle Serumröhrchen mit Trenngel präpariert (SST, BD, Heidelberg, Deutschland). Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Röhrchen 20 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Blutserum als Überstand isoliert. Blutplasma wurde als Nebenprodukt der Dichtegradientenzentrifugation von Vollblut (3.4.2) gewonnen.

Für einige Experimente wurden Blutzellen aus Zellfiltern präpariert, die zur Depletion von Leukozyten aus regulären Vollblutspenden dienten. Die Filter wurden unmittelbar nach ihrer Verwendung von der Blutspendeabteilung der Charité (Institut für



Transfusionsmedizin, Campus Mitte, Berlin, Deutschland) bezogen und bearbeitet. Alle Blutspender wurden ärztlich untersucht und gaben zusätzlich selbst an, gesund zu sein. Serologische Tests fanden erst nach der Verwendung der gewonnenen Zellen statt und wurden nicht als Kriterium einbezogen.

Ein Patient mit SLE wurde im Rahmen der hämatologischen Diagnostik am Beckenkamm punktiert und Knochenmarksaspirat in mit Heparin beschichteten Röhrchen gewonnen. Reste des Präparats wurden nach klinischer Diagnostik für Experimente genutzt.

Die Zellgewinnung aus humanen Geweben oder Blut fand regulär maximal 6 h nach Entnahme des Gewebes statt. Gewebepräparate und Blutfilter wurden gekühlt, Vollblut bei Raumtemperatur aufbewahrt. Einige Blutproben von RA-Patienten wurden per Post zugesandt und etwa 18 h nach Entnahme bearbeitet. Kontrollexperimente bestätigten die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten aus ein und derselben Blutprobe, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entnahme analysiert wurde.

### **3.3 Laborausrüstung**

Alle Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsklasse S1 im Deutschen Rheumaforschungszentrum und im Forschungslabor Prof. Dörner, Institut für Transfusionsmedizin, Charité Campus Mitte, Berlin durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde folgende Ausrüstung benötigt:

- eine Sterilwerkbank mit Personenschutz (Heraeus, Hanau, Deutschland),
- einstellbare Einfach- und Mehrkanalpipetten (Gilson, Middleton, WI und Eppendorf, Hamburg, Deutschland, BioZym, Hessisch Oldendorf, Deutschland),
- gekühlte und ungekühlte Zentrifugen mit Einsätzen für Eppendorfreaktionsgefäße aus Polyethylen (0,5 - 2,0 ml, Eppendorf und Heraeus),
- FACS-Röhrchen (Polystyrol, Corning Costar, Corning, NY und Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland),
- Zentrifugenröhrchen (Polypropylen, 15 ml, 50 ml, Corning und Sarstedt),
- serologische Pipetten (Glas oder Polystyrol, Watte, Hirschmann, Eberstadt,

Deutschland und Corning Costar, Corning, NY),

- Pipettenspitzen (10, 100, 200, 300, 1000 µl, Plastik, Biozym, Corning Costar und Eppendorf),
- Pasteurpipetten (Glas, Roth, Karlsruhe, Deutschland),
- Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm, Millipore, Bedford, MA),
- Petrischalen (Polystyrol, Corning Costar, Corning, NY),
- Perfusorspritzen Norm-Ject (Plastik, Henke-Sass, Wolff, Tuttlingen, Deutschland),
- Kanülen (Stahl und Plastik, Braun, Melsungen, Deutschland),
- verschiedene Zellkulturplatten (Polystyrol, Greiner, Kremsmünster, Österreich),
- eine Vakuumabsaugstation (Neuberger, Freiburg, Deutschland),
- ein temperierbares Wasserbad (Haake, Berlin, Deutschland),
- Kühl- und Gefrierschränke (4 °C, -20 °C, -70 °C, Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland und Heraeus, Hanau, Deutschland),
- ein temperierbarer Inkubator mit 5 % CO<sub>2</sub> Supplementierung (Heraeus, Hanau, Deutschland),
- ein Wärmeschrank (37 °C, Memmert, Schwabach, Deutschland),
- Schutzhandschuhe und -brille,
- Eisbehälter,
- verschiedenes Ständermaterial (Roth, Karlsruhe, Deutschland),
- eine Laborwaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland),
- Pipetboys (Hirschmann, Eberstadt, Deutschland),
- ein Vortexer (IKA Works Inc., Wilmington, NC),
- Handstepper mit Zubehör (Eppendorf und Brand, Wertheim, Deutschland),
- ein Heizrührer (IKA, Staufen, Deutschland),
- Messbecher, Bechergläser, Erlenmeyerkolben und Glasflaschen (Glas, Schott, Mainz, Deutschland) sowie

- ein Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit Zubehör (Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Die Zusammensetzungen von Puffern und Medien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung von Puffern und Medien für zellbiologische Arbeiten.**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herkunft
PBS (phosphate buffered saline)	ddH <sub>2</sub> O	DRFZ, Berlin, Deutschland
	137 mM NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	2,7 mM KCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
	8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2	
PBS/BSA (PBS mit Rinderserumalbumin)	PBS	
	0,2 % BSA (bovine serum albumin)	Biomol, Hamburg, Deutschland
PBS/BSA/Azid	PBS/BSA	
	0,02 % Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RPMI 1640 Glutamax	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA
RPMI komplett	RPMI 1640 Glutamax	
	10 % fötales Kälberserum	Life Technologies, Paisley, Großbritannien
	100 U/ml Penicillin	
	100 µg/ml Streptomycin	
doppelt destilliertes Wasser	ddH <sub>2</sub> O	DRFZ, Berlin, Deutschland

### 3.4 Isolation humaner Primärzellen

#### 3.4.1 Herstellung von Zellsuspensionen

Zellen aus Gewebeproben wurden mechanisch gewonnen, ohne Verwendung enzymatischer Verfahren. Knochenmarkproben wurden mit einem Skalpell und einem sterilen Teppichmesser (Edelstahl, Roth, Karlsruhe, Deutschland) zerkleinert und anschließend mit Hilfe einer Spritze mit PBS/BSA/EDTA ausgespült bzw. ausgeschüttelt. Das in den Knochenmarkproben enthaltene Fett wurde durch mehrfaches Überführen der Suspension in frische 50 ml-Röhrchen und kurzes Schütteln mit ca. 15 ml frischem, kaltem PBS-Puffer entfernt. Das Fett haftete an der Plastikwand der Röhrchen, während die wässrige Zellsuspension wiedergewonnen wurde. Alle Zellsuspensionen aus Geweben wurden filtriert (Cellstrainer, 70 µm, BD, Heidelberg, Deutschland) und der Dichtegradientenzentrifugation unterzogen.

Leukozytenfilter wurden entgegen der für den regelrechten Gebrauch ausgewiesenen Richtung mit einer Perfusorspritze mit 2 - 3 x 20 ml PBS gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde ebenfalls einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen.

### 3.4.2 Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung mononukleärer Zellen

Zur Anreicherung von Lymphozyten wurde die Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt [209]. Dabei wird die verschiedene Dichte der Zelltypen bei der Sedimentation in einem flüssigen 2-Phasen-System ausgenutzt (Stokes'sches Gesetz), um mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) von Zellen höherer Dichte (Granulozyten und Erythrozyten) und geringerer Dichte (Thrombozyten) abzutrennen. Dazu wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen 15 ml Lymphozytenseparationsmedium vorgelegt (ein synthetisches Sucrose-Epichlorohydrin-Polymer mit einem Molekulargewicht von durchschnittlich 400 kDa, mit Natriumdiatrizoat, Calciumdinatrium-EDTA, Dichte 1,077 g/ml, PAA Laboratories, Pasching, Österreich oder Ficoll-PaquePlus, Amersham, Uppsala, Schweden) und mit 30 ml eines 1 : 1<sub>v/v</sub> Blut-PBS-Gemischs überschichtet. Die Röhrchen wurden 20 min bei Raumtemperatur und 1800 rpm (400 x g) ohne Bremse zentrifugiert. Danach waren im Röhrchen drei Phasen erkennbar: ein Sediment aus Erythrozyten und granulären Zellen, darüber das Separationsmedium, an dessen Grenzfläche zum Blutplasma eine weißliche, aus mononukleären Zellen bestehende Schicht, und darüber das Blutplasma einschließlich Thrombozyten. Zunächst wurden etwa zwei Drittel des Blutplasmas entfernt und teilweise zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Danach wurden mononukleäre Zellen aus der Grenzschicht mit einer serologischen Pipette aufgenommen, in ein frisches 50 ml-Röhrchen überführt und zweimal in 50 ml kaltem PBS/BSA-Puffer gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 1200 rpm, 180 x g, 4 °C). Teilweise wurden LeucoSep-Röhrchen (Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland) gemäß Herstellerangaben verwendet, die zusätzlich eine Filterscheibe enthielten, die das Überschichten der Zellsuspension erleichterte. Für bestimmte, ausgewiesene Experimente wurden bereits in diesem Präparationsschritt passiv B-Lymphozyten angereichert. Dazu wurde das RosetteSep *B cell enrichment kit* (Cell Systems, St. Katharinen, Deutschland) gemäß Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurde zum Blut-PBS-Gemisch ein Antikörpermisch hinzugegeben, wodurch alle Nicht-B-Zellen mit Erythrozyten vernetzt wurden. In der nachfolgenden Dichtegradientenzentrifugation wurden die vernetzten Zellen zusammen mit den Erythrozyten sedimentiert, sodass unter den isolierten mononukleären Zellen CD19<sup>+</sup> B-Zellen bereits sehr stark angereichert

vorlagen und etwa 75 % des Zellisolats ausmachten.

Alle Zellsuspensionen wurden, soweit in den folgenden Versuchsprotokollen nicht anders angegeben, kühl und dunkel aufbewahrt und zeitnah weiterverarbeitet.

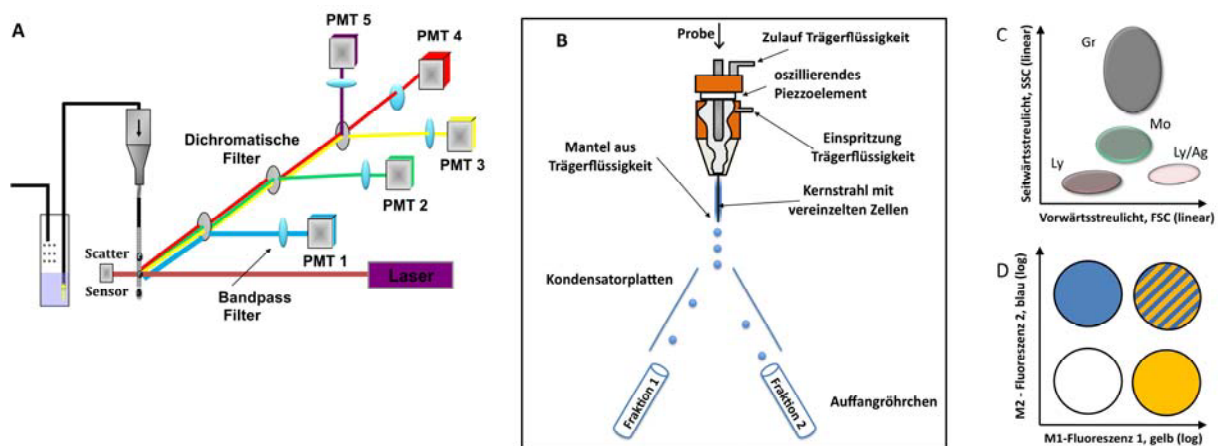
### **3.5 Durchflusszytometrie und Zellsortierung**

#### **3.5.1 Methode und Prinzip der Durchflusszytometrie**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) werden Zellen individuell vermessen und charakterisiert. Das automatisierte Verfahren findet in Durchflusszytometern statt. Die Zellen werden dabei durch hydrodynamische Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrahl vereinzelt, sodass sie sukzessive eine Messküvette durchlaufen und dabei analysiert werden können. Zur Vermessung werden die Zellen mit Laserlicht bestrahlt. Dabei werden die beim Durchtritt durch die Zelle physikalisch veränderten Lichteigenschaften (Beugung/Brechung) durch Signaldetektoren, ein System von optischen Spiegeln und Filtern sowie Verstärkern (*photomultiplier*) erfasst (Abb. 6A) und einer Steuerungs- und Analysesoftware zugänglich gemacht. Als Messparameter dienen hierbei das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches beim Durchtritt durch die Zelle um 3 bis 10° abgelenkt wurde, sowie das durch Reflektion beim Zelldurchtritt um 90° abgelenkte Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC). Der FSC-Wert einer Zelle korreliert mit deren Größe, der SSC-Wert spiegelt Granularität und Ausmaß der Membranfaltung innerhalb einer Zelle wider. Darauf aufbauend kann gleichzeitig die Expression membranständiger und intrazellulärer Proteine (oder anderer Moleküle) detektiert werden. Hierfür werden analytische Antikörper verwendet, die spezifisch an das zu detektierende Protein binden und chemisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Wird ein bestimmtes Protein von einer Zelle exprimiert, erscheint diese nach Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörper im Laserlicht des Durchflusszytometers als fluoreszent (Abb. 6A,C). So kann anhand der Streulichteigenschaften und der verfügbaren Fluoreszenzkanäle (zur Zeit maximal 17 [210]) von jeder einzelnen Zelle ein charakteristisches Profil erstellt werden. Die Limitierung der Kanalanzahl ergibt sich vor allem aus der Überlappung der Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Dies führt zur gegenseitigen Verzerrung der Messergebnisse in den einzelnen

Fluoreszenzdetektoren. Das Ausmaß dieser Effekte kann berechnet und ein Messwert entsprechend korrigiert werden („Kompensation“ [211, 212]).

Anhand der durchflusszytometrisch erfassten Eigenschaften können Zellen physisch voneinander getrennt werden (Zellsortierung). Nach Durchlaufen des Detektionssystems erfolgt mit Hilfe eines spannungsgesteuerten, schwingenden Piezoelements die Zerlegung des Flüssigkeitsstrahls in einzelne Tröpfchen, die jeweils genau eine Zelle enthalten. Diese Tröpfchen werden elektrostatisch aufgeladen und in einem elektrischen Feld derart abgelenkt, dass die ursprüngliche Zellsuspension in bis zu 4 definierte Fraktionen aufgetrennt wird.



**Abb. 6: Prinzipskizze durchflusszytometrischer Zellanalyse und -sortierung und Darstellung durchflusszytometrischer Daten.**

(A) Eine Suspension fluorescent markierter Zellen wird passiv durch Überdruck in das Durchflusszytometer eingespeist. Nach hydrodynamischer Fokussierung durchläuft der Zellenstrahl die Messküvette, wo Laserlicht auf die Zellen trifft, woraufhin das dann von den Zellen abgegebene Licht erfasst wird. Dieses Licht wird zur Erfassung der Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften in einem System optischer Filter und Spiegel anhand seiner Wellenlänge zerlegt, in Photodetektoren (PMT) detektiert und in elektronische Signale umgewandelt. In der gezeigten Anordnung wäre die Expression von 5 verschiedenen Molekülen plus Streulichteigenschaften möglich. (B) Schema der durchflusszytometrischen Zellsortierung. (C) Diagrammschema zur zweidimensionalen Darstellung von Streulichteigenschaften mit linearer Achseneinteilung. Anhand der FSC- und SSC-Werte lassen sich unter den weißen Blutzellen kleine (Ly) und große Lymphozyten/Lymphozytenaggregate (Ly/Ag), Monozyten (Mo) und Granulozyten (Gr) voneinander abgrenzen. (D) Doppeltlogarithmisches Diagramm [212] (schematisch) zur gleichzeitigen Darstellung zweier verschiedener Fluoreszenzparameter („blau“ und „gelb“), die jeweils die Expression eines bestimmten Moleküls (M1, M2) widerspiegeln. Ein Teil der Zellen exprimiert keines der getesteten Moleküle (weiß), eine Fraktion exprimiert M1, aber nicht M2 (gelb), eine weitere nicht M1, aber M2 (blau). Zellen, die beide Moleküle exprimieren, weisen Fluoreszenzsignale in beiden Kanälen auf (gelb + blau).

### 3.5.2 Durchführung durchflusszytometrischer Analysen

Zur Durchführung einer FACS-Analyse oder Zellsortierung wurde eine Einzelzellsuspension mit einem Gemisch fluoreszenzmarkierter Antikörper 10 min bei 4 °C in einem Gesamtvolumen von 50 - 200 µl PBS/BSA in Eppendorf-Reagenzgefäßen oder FACS-Röhrchen inkubiert und nachfolgend 1 - 3-mal in PBS/BSA-Puffer gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen zwischen Zellen und Antikörpern, die durch die Expression von Fc-Rezeptoren vermittelt werden können, wurden die Zellen vor der Zugabe der Antikörper mit humanem Immunglobulin (Beriglobin, ZLB Behring, Marburg, Deutschland oder *FcR blocking* Reagenz, Miltenyi BioTec, Bergisch Gladbach, Deutschland) kokubiert. Ausgenommen waren hier Messungen, bei denen Oberflächenimmunglobuline auf den Zellen detektiert werden sollten, da die humanen Immunglobuline die entsprechenden Antikörper neutralisieren könnten. Die Proben wurden höchstens 6 h nach der Färbung am Durchflusszytometer gemessen und bis dahin dunkel und kühl aufbewahrt.

Zur Detektion intrazellulärer Antigene wurden die Zellen nach der Färbung der Oberflächenantigene zweimal in PBS gewaschen und 20 min in 2 % Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch 0,5 % Saponinlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, gelöst in PBS/BSA/Azid-Puffer) unter Zugabe der Antikörper für die Detektion intrazellulärer Proteine permeabilisiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 0,1 % Saponinlösung wurden die Zellen bis zur FACS-Analyse in PBS/BSA/Azid-Puffer aufbewahrt. Bei der Verwendung der sekundären Detektionssysteme Biotin/Streptavidin bzw. Digoxigenin/Anti-Digoxigenin wurden die Inkubations- und Waschschriffe entsprechend wiederholt.

Die durchflusszytometrischen Messungen und Zellsortierungen fanden in der *flow cytometry core facility* (FCCF) am Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ) statt. Zur Analyse wurde die frisch resuspendierte und gegebenenfalls filtrierte Zellsuspension (30 µm, unsteril, Partec, Münster, Deutschland oder steril, Miltenyi Biotec) passiv eingespeist (Abb. 6A) und im Gerät mit FACS-Flow (PBS/0,02 % NaN<sub>3</sub>) verdünnt, gemessen und nach der Messung verworfen. Bei der Analyse lebender Zellen wurden tote Zellen durch Zugabe des DNA-interkalierenden

Farbstoffs 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Endkonzentration 200 nM, Molecular Probes, Eugene, OR) unmittelbar vor der Analyse im Zytometer sichtbar gemacht und konnten so von der Datenauswertung ausgeschlossen werden. Zellaggregate wurden ebenfalls elektronisch von der Analyse in der FSC-A - FSC-H - Darstellung ausgeschlossen (Abb. 9A,B).

**Tabelle 2: Fluoreszenzeigenschaften und Detektion für die Durchflusszytometrie verwendeter Farbstoffe.**

Die Angaben zu Kanälen und Filternutzung beziehen sich auf die Konfiguration des LSR II (BD, Heidelberg, Deutschland). Die Absorption des Laserlichts wird als Wellenlängenbereich bzw. als Maximum angegeben (LP, longpass-Filter, BP, bandpass-Filter).

Farbstoff	Kurzbezeichnung	Detektionskanal	Absorption [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Filternutzung (LP/BP)
Phycoerythrin-Cyanin 7	PE-Cy7	Blau A	488 - 532	785	780/60
Phycoerythrin-Cyanin 5	PE-Cy5	Blau B	485 - 560 und 650	670	670/14
Peridinin-Chlorophyllprotein	PerCp	Blau B	455 - 510	675	670/14
R-Phycoerythrin	PE	Blau D	480 - 564	575	575/26
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	Blau E	496	520	520/30
Allophycocyanin-H7	AH7	Rot A	650	765	780/60
Allophycocyanin-Alexa 750	APC-A750	Rot A	650	767	780/60
Cyanin 5	Cy5	Rot C	645	665	655/15
Allophycocyanin	APC	Rot C	650	660	655/15
Alexa 405	A405	Violett C	405	421	440/40
Pacific Blue (6,8-Difluoro-7-hydroxykumarinderivat)	PacB	Violett C	405	455	440/40
4',6-Diamidino-2-phenylindol	DAPI	Violett C, UV C	310 - 390	460	440/40
Alexa 350	A350	UV C	350	445	440/40

Als Analysegerät diente ein LSR II (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland), der 4 Laser zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen enthielt: 488 nm (blau), 632 nm (rot), 405 nm (violett) und 320 nm (UV). Die Steuerung des Geräts sowie die Kompensation der Daten erfolgte mit der FACS-Diva Software (BD, Heidelberg, Deutschland). Durchflusszytometrische Daten wurden mit der Software „FlowJo“ (Tree Star Inc., Ashland, OR) dargestellt (schematische Beispiele in Abb. 6C) und ausgewertet. Zur Sortierung von Zellen in Röhrchen oder Mikrotiterplatten (Abb. 6B) wurden FacsAria und FacsDiva Geräte verwendet (beide BD, Heidelberg, Deutschland). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die eingesetzten Fluorochrome und ihre Fluoreszenzcharakteristika, Tabelle 3 enthält alle verwendeten Antikörper und fluoreszenten Reagenzien für die Durchflusszytometrie.

Bei humanen B-Lymphozyten ist die Expression von  $\beta_7$ -Integrin identisch mit der des  $\alpha_4\beta_7$ -Integrindimers [177].  $\alpha_4$ -Integrin wird von allen peripheren



CD19<sup>+</sup>/CD38<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen exprimiert [157].  $\alpha_E$ -Integrin als ein potentieller alternativer Dimerisierungspartner für  $\beta_7$ -Integrin wurde nicht von CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen exprimiert (ohne Abbildung). Daher wurde die FIB504-Färbung als ein Maß für die Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und  $\beta_7$ -Integrin verwendet.

***Tabelle 3: Antikörper und Sekundärreagenzien für die Durchflusszytometrie (umseitig).***

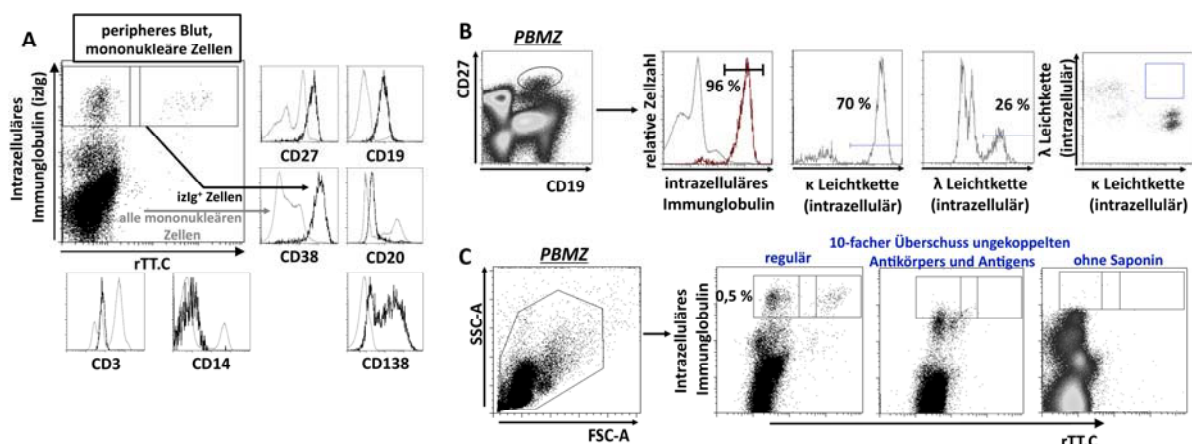
Die Reagenzien wurden entweder als Konjugate bezogen oder im DRFZ mit Fluoreszenzfarbstoffen, Biotin oder Digoxigenin gekoppelt (H. Hecker-Kia, H. Schliemann, T. Geske). In diesem Fall stammten die Farbstoffe, Biotin und Digoxigenin von Molecular Probes, Eugene, OR, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland oder Pierce, Rockford, IL. Wurden von einem Reagenz verschiedene Konjugate benutzt, sind diese zusammen angegeben. Alle angegebenen Antikörper sind Immunglobuline der Maus oder der Ratte und ihre Bindungsspezifität wurde gegebenenfalls durch isotypengleiche Antikörper mit irrelevanter Spezifität kontrolliert.

Antikörper (Anti-) oder Reagenz	Konjugat	Klon	Hersteller
CD19	PE, FITC	HD37	Dako, Hamburg, Deutschland
CD19	PerCp, PE-Cy7	SJ25C1	BD, Heidelberg, Deutschland
CD27	Cy5, PE, FITC	2E4	René van Lier, Universität Amsterdam, Niederlande
$\kappa$ Leichtkette	FITC, Biotin	G20-193	BD
$\lambda$ Leichtkette	FITC, Biotin	JDC-12	BD
CD38	FITC, PE, APC	HIT2	BD
CD20	FITC, A405	2H7	BD und Serotec, Düsseldorf, Deutschland
CD20	PerCp	L27	BD
HLA-DR	FITC, Cy5	L243	DRFZ, Berlin, Deutschland
HLA-DR	PE	TÜ36	BD
$\beta_7$ -Integrin	PE	FIB504	BD
CD62L	FITC, PE	145	Miltenyi BioTec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD62L	PE-Cy5	Dreg-56	BD
Ki-67	FITC	MIB-1	Dako
CD138	PE	B-B4	Chemicon/Millipore, Schwalbach, Deutschland und Miltenyi
IgG	FITC, Biotin	G18-145	BD
IgA	Biotin	G20-359	BD
IgM	Biotin, PE	G20-127	BD
CD45	PerCp	2D1	BD
CD3	FITC, PacB	UCHT1	DRFZ, BD
CD14	Cy5	TM1	DRFZ
HLA-DR	FITC	30	DRFZ
IgA	FITC	M24A	Chemicon/Millipore
CD14	PacB	M5E2	BD
CCR10	PE, APC	314305	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
CCR9	PE	112509	R&D Systems
$\alpha_E$ -Integrin	FITC	Ber-ACT8	BD
CLA	FITC	HECA-452	BD
CD49d	FITC	9F10	BD
CD95	PE	DX2	BD
CD3	APC-H7	Leu4	BD
CD14	APC-H7	MφP9	BD
rTT.C	Dig	-	Roche Diagnostics, Indianapolis, IN
TT	PE	-	Novartis Behring, Marburg, Deutschland

IgD	PE, FITC, Biotin	IA6-2	BD
Maus IgG1	FITC	DAK-GO1	Dako
Maus IgG1	FITC, PE	11711	R&D Systems
Maus IgG1	FITC, PE	MOPC-21	BD
Maus IgG2a	FITC, PE	G155-178	BD
Maus IgG2a	FITC, PE	20102	R&D Systems
Maus IgG2b	FITC, PE	20-35	BD
Maus IgG2b	FITC, PE	133303	R&D Systems
Ratte IgG2a	PE	54447	R&D Systems
Ratte IgG2a	PE	R35-95	BD
DAPI	-	-	Molecular Probes, Eugene, OR
Streptavidin	-	FITC, PE, PerCp	BD
Streptavidin	-	PacB	Molecular Probes
Streptavidin	-	APC-A750	Caltag, Burlingame, CA
Anti-Dig	-	FITC, PE, A350	Roche Diagnostics

### 3.5.3 Durchflusszytometrische Detektion von Plasmablasten und Plasmazellen

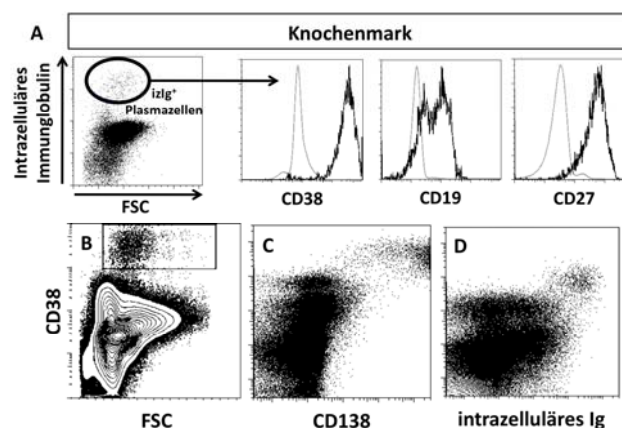
Plasmablasten und Plasmazellen wurden in dieser Arbeit als intrazellulär Immunglobulin exprimierende (izIg<sup>+</sup>) Lymphozyten dargestellt oder anhand des charakteristischen Expressionsprofils ihrer verschiedenen Oberflächenproteine als CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/(CD38<sup>stark</sup>)/(CD20<sup>-</sup>) Lymphozyten im Blut oder CD38<sup>stark</sup>/(CD138<sup>+</sup>) Lymphozyten im Knochenmark identifiziert (Abb. 7A,B, 8A-D, 9A,B).



**Abb. 7: Durchflusszytometrische Detektion von Plasmablasten und Plasmazellen des peripheren Blutes.**

7 Tage nach einer Sekundärimmunisierung mit Tetanusimpfstoff wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildungen sind repräsentativ für mindestens 2 unabhängige Experimente. (A) Detektion von Plasmablasten und Plasmazellen als intrazellulär immunglobulinexprimierende Zellen unter PBMZ. Verglichen mit den gesamten PBMZ waren izIg<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen CD27<sup>stark</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD38<sup>stark</sup>, CD20<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup> und CD138<sup>+/-</sup>. Gleichzeitig wurde zu diesem Zeitpunkt nach Immunisierung eine Population Tetanustoxin C-Fragment bindender izIg<sup>stark</sup> Zellen detektiert (izIg<sup>stark</sup>/rTT.C<sup>+</sup> tetanusspezifische Plasmablasten). (B) Als Gegenprobe wurden CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup> Lymphozyten elektronisch eingegrenzt und auf die Expression intrazellulären Immunglobulins untersucht. Fast alle CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup> Lymphozyten exprimierten izIg, wobei von den einzelnen Zellen entweder die  $\kappa$ - oder die  $\lambda$ -Leichtkette exprimiert wurde, nicht jedoch beide Leichtketten. Im Gegensatz zu allen anderen PBMZ sezernierten CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup> Lymphozyten als einzige Zellen Antikörper im EliSpot-Verfahren [56, 213, 214]. (C) Kontrolle der Spezifität der izIg- und rTT.C-Färbung durch die kompetitive Koinkubation mit der 10-fachen Konzentration ungekoppelter Immunglobulinleichtketten-spezifischer Antikörper und rTT.C im Färbensatz. Dieser Blockierungsversuch führte zu einem etwa 10-fach schwächeren Fluoreszenzsignal (antigenspezifischer) Plasmablasten in beiden dargestellten Messkanälen. Die intrazelluläre Lokalisierung der angefärbten Immunglobuline in Plasmablasten und Plasmazellen wurde durch die Auslassung der Zellpermeabilisierung mit Saponin kontrolliert. Folglich drangen die Färbereagenzien nicht in die Zelle ein und die regelrechte Färbung wurde inhibiert.

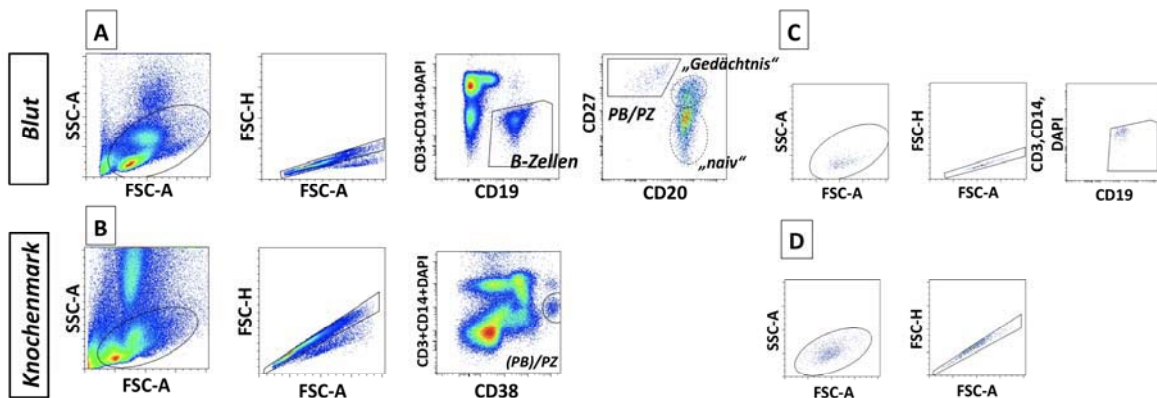
Plasmablasten und Plasmazellen besitzen als antikörpersezernierende Zellen die unikate Eigenschaft, sehr große Mengen Immunglobulin zu produzieren, die in großer Menge auch in der Zelle nachgewiesen werden können. Die durchflusszytometrische Detektion dieser intrazellulär exprimierten Immunglobuline in den Plasmablasten und Plasmazellen wurde durch Antikörper erreicht, die infolge der Permeabilisierung der Zellen mit Saponin spezifisch intrazelluläre Immunglobulinleichtketten banden (Abb. 7A-C, 8D). Die Erfassung von Plasmablasten und Plasmazellen anhand ihres spezifischen Oberflächenphänotyps wurde durch die gleichzeitige durchflusszytometrische Detektion der oben angegebenen Moleküle erreicht. Während die intrazelluläre Methode sehr zuverlässig Plasmablasten und Plasmazellen anhand der starken Expression intrazellulärer Immunglobuline als funktionelles Korrelat der Antikörperproduktion detektiert, erlaubt die Detektion anhand des Oberflächenphänotyps die genauere Quantifizierung und weitere phänotypische Charakterisierung dieser Zellpopulation bei geringerem experimentellen Aufwand. Beide Methoden wurden in initialen Experimenten vergleichend gegenübergestellt und sorgfältig kontrolliert (Abb. 7, 8, 9C,D) sowie exemplarisch mit korrespondierenden EliSpot-Ergebnissen verglichen (Abb. 13). Abbildungen 7 und 8 demonstrieren, dass die verwendeten Methoden zum Nachweis von Plasmablasten und Plasmazellen aus Blut und Knochenmark vergleichbar sind, da sie dieselben Zellen detektierten.



**Abb. 8: Plasmazellen des Knochenmarks koexprimieren CD38, CD138 und intrazelluläres Immunglobulin.**

(A) Unter den mononukleären Zellen des Knochenmarks wurden izlg<sup>stark</sup> Zellen eingegrenzt und die Expression von CD38, CD19 und CD27 analysiert. Übereinstimmend mit früheren Ergebnissen exprimierten izlg<sup>stark</sup> Plasmazellen CD38<sup>stark</sup>, CD19<sup>+</sup> und CD27<sup>+</sup> (schwarz: izlg<sup>stark</sup> Plasmazellen; grau: alle mononukleären Zellen des Knochenmarks). (B-D) Als Gegenprobe wurde bei CD38<sup>stark</sup> Zellen aus dem Knochenmark die starke Expression von CD138 und intrazellulärem Immunglobulin nachgewiesen.

In Blut und Knochenmark lag die Frequenz von Plasmablasten und Plasmazellen normalerweise deutlich unter 1 % der mononukleären Zellen, unter Rituximab-Therapie zum Teil bei nur 0,01 %, und war somit sehr niedrig (Abb. 36). Es gibt keinen abschließenden Konsens für die Behandlung der Signifikanzproblematik bei der durchflusszytometrischen Analyse niedrigfrequenter Zellpopulationen [215]. Hier wurden zur Gewährleistung der Signifikanz der untersuchten Zellfraktionen je nach experimenteller Zielsetzung bis zu  $2,5 \times 10^6$  mononukleäre Zellen je Ansatz durchflusszytometrisch akquiriert und analysiert. Zusätzlich wurden die verwendeten Detektionsverfahren sorgfältig durch sukzessive Mehrfachmessungen sowie methodische Kontrollen (Isotypkontrollen, *fluorescence-minus-one* (FMO)-Strategie, Austausch der Fluoreszenzfarbstoffe) kontrolliert.



**Abb. 9: Exemplarische Eingrenzungsstrategie zur Detektion von Plasmablasten und Plasmazellen im Blut und im Knochenmark anhand des Expressionsprofils der Oberflächenmarker CD3, CD14, CD19, CD20, CD27 und CD38.**

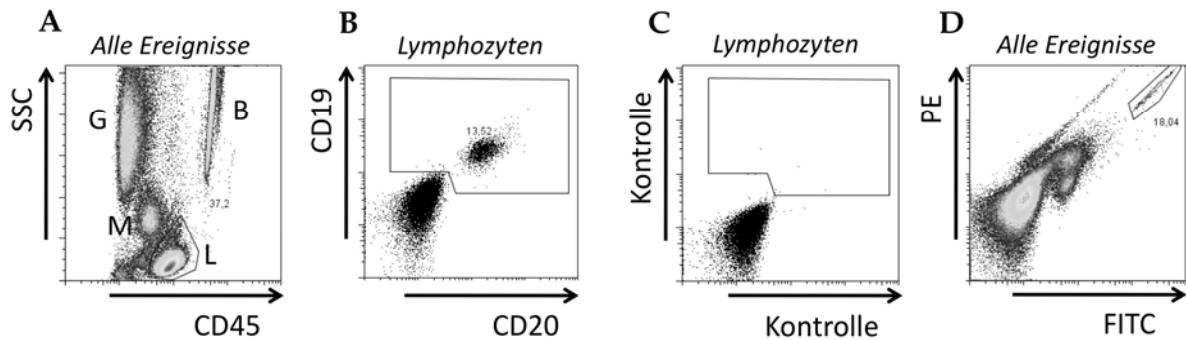
(A) Unter PBMZ wurden kleine und große Lymphozyten sowie Monozyten eingegrenzt, dabei restliche Erythrozyten und Granulozyten sowie Zellschrott (Debris) ausgeschlossen. Durch die Auftragung von FSC-H gegen FSC-A wurden Zellaggregate identifiziert, die von der Analyse ausgeschlossen wurden. Unter diesen Einzelzellen wurden  $CD19^+$  B-Zellen eingegrenzt, wobei gleichzeitig  $CD3^+$  T-Zellen,  $CD14^+$  Monozyten und  $DAPI^+$  tote Zellen in einem kombinierten Kanal (*dumb channel*) ausgegrenzt wurden. Dadurch wurde eine hohe elektronische Reinheit der weiterhin analysierten B-Zellen gewährleistet. Unter den  $CD19^+$  B-Zellen zeichneten sich Plasmablasten und Plasmazellen (PB/PZ) durch den Verlust der CD20-Expression sowie die hohe Expression von CD27 aus und bildeten darauf basierend neben naiven B-Zellen ( $CD27^+/CD20^+$ ) und Gedächtnis-B-Zellen ( $CD27^+/CD20^+$ ) eine distinkte Population („PB/PZ“). (B) Im Knochenmark wurden lymphoide Zellen einschließlich großer Zellen eingegrenzt und Granulozyten ausgeschlossen. Nur Einzelzellen wurden weiter analysiert. Hier wurden Zellen des Phänotyp  $CD38^{stark}/CD3^-/CD14^-/DAPI^-$  als vitale Plasmazellen zur weiteren Analyse ausgewählt. (C + D) Darstellung von Plasmablasten und Plasmazellen in den zuvor für ihre Eingrenzung verwendeten Diagrammen (*backgating*). In Blut- und Knochenmarkproben bildeten sie eine hinsichtlich ihrer Streulichteigenschaften und der für ihre Identifikation verwendeten Oberflächenmarker homogene Zellpopulation und validieren die verwendete Analysestrategie.

#### 3.5.4 Detektion tetanusspezifischer Plasmablasten

Im Zusammenhang mit Tetanusimmunisierungen stand die Charakterisierung zirkulierender, antigenspezifischer Plasmablasten im Vordergrund der experimentellen Untersuchungen. Diese Zellen wurden anhand der spezifischen Bindung an das rekombinant hergestellte, atoxische C-Fragment des Tetanustoxins [216, 217] (rTT.C, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) [152] oder an das gesamte Tetanustoxoidmolekül detektiert. Für ihre Visualisierung in der Durchflusszytometrie wurden die Peptide mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass durch die Koinkubation von PBMZ und dem fluoreszenten Peptid alle TT- oder rTT.C-reaktiven B-Zellen fluoreszent markiert vorlagen (Abb. 7C). Das rTT.C besteht aus 451 Aminosäuren, enthält etwa 30 - 50 % der für den Menschen immunogenen Determinanten und wiegt etwa 50 kDa, was etwa ein Drittel des Molekulargewichts des Tetanustoxins ausmacht. Es entspricht dem C-Fragment, welches aus dem enzymatischen Papainverdau des Tetanustoxins hervorgeht. Weiterhin korrelierte die gemessene Anzahl der rTT.C-bindenden Zellen im Elispot mit der durchflusszytometrisch erfassten Anzahl derselben Zellen (Abb. 13). Die Spezifität der Detektion tetanusspezifischer Plasmablasten wurde durch Blockierungsexperimente belegt (Abb. 7C). Abb. 15 zeigt die Kinetik des Auftretens TT- und rTT.C-reaktiver B-Zellen nach sekundärer Immunisierung mit Tetanusimpfstoff im peripheren Blut.

#### 3.5.5 Durchflusszytometrische Zellzahlbestimmung

Für die Erhebung absoluter Zellzahlen von B-Lymphozyten im peripheren Blut wurde das TruCount-System (BD, Heidelberg, Deutschland) mit den Antikörperkonjugaten Anti-CD45-PerCp, Anti-CD19-PE, Anti-CD20-FITC und Anti-CD14-PacB gemäß Herstellerangaben verwendet (Abb. 10). In den Teströhrchen befand sich eine bekannte Anzahl an fluoreszenten Partikeln, denen 50 µl Vollblut hinzugegeben wurde. Partikel und  $CD45^{++}/CD14^{-}/SSC^{schwach}/CD19^{+}/CD20^{+/-}$  B-Zellen wurden durchflusszytometrisch quantifiziert und daraus die absolute B-Zell-Zahl in der Probe bestimmt.



**Abb. 10: Bestimmung absoluter B-Zell-Zahlen durch die Trucount-Methode.**

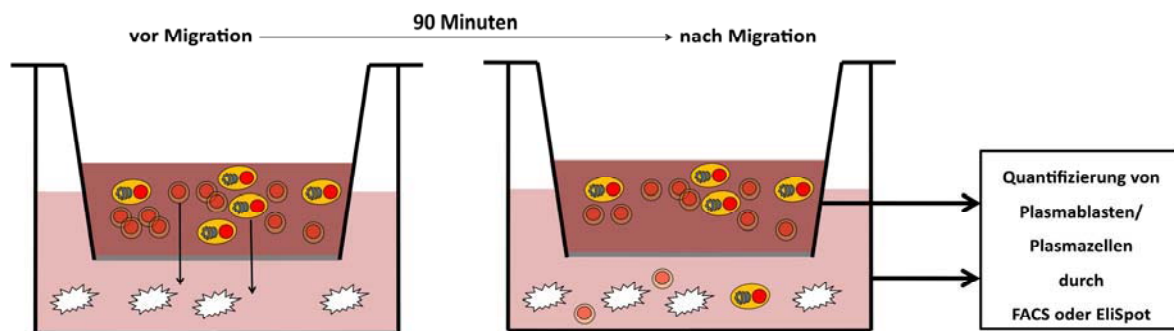
Vollblut wurde mit Antikörpern gegen CD45, CD19 und CD20 inkubiert, Erythrozyten wurden lysiert und die verbleibenden Zellen durchflusszytometrisch analysiert. (A) Es wurden nur Ereignisse akquiriert, die einen bestimmten Schwellenwert der CD45-PerCp-Fluoreszenz überschritten. Somit wurde die Erfassung aller fluoreszenten Partikel und CD45<sup>++</sup> Lymphozyten (L) sichergestellt. Außerdem waren Granulozyten (G), Monozyten (M) und die fluoreszenten Partikel (B) sichtbar. CD45<sup>++</sup>/SSC<sup>schwach</sup> Lymphozyten wurden eingegrenzt und weiter auf Anwesenheit von CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+/-</sup> B-Zellen hin getestet (B). (C) Die Isotypkontrolle belegt die Spezifität der Detektion von CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+/-</sup> B-Zellen. (D) Eingrenzung der fluoreszenten Partikel als FITC<sup>stark</sup>/PE<sup>stark</sup> Population.

### 3.6 In vitro Transmigrationsexperimente

#### 3.6.1 Versuchsprinzip des Transmigrationsexperiments

Mittels des *in vitro* Transmigrationsversuchs konnte die zielgerichtete Bewegung von Plasmablasten entlang eines chemischen Konzentrationsgradienten (Chemotaxis) außerhalb des Körpers nachgewiesen werden. Chemotaktische Zytokine sind sogenannte Chemokine, in der Regel lösliche Proteine, die an Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche binden und bei den Zellen Chemotaxis auslösen (siehe Einleitung). Dabei korreliert die Chemokinrezeptorexpression auf mRNA-Ebene nicht immer mit der des Proteins und dem Ausmaß des Migrationsverhaltens, wie insbesondere für B-Zellen und Plasmablasten bzw. Plasmazellen gezeigt wurde [129, 152, 195, 218, 219]. *In vitro* Transmigrationsversuche reflektieren daher realistisch die *in vivo*-Situation und die chemotaktisch funktionelle Expression eines Chemokinrezeptors. In den hier durchgeführten Versuchen wurde die Porengröße auf 5 µm festgelegt und die Membran mit Fibronectin beschichtet, um eine extrazelluläre Matrixbarriere zu simulieren [129, 220]. Da Plasmablasten bzw. Plasmazellen  $\geq 10$  µm groß sind [221], sind spezifische Umordnungen des Zytoskeletts einer Zelle notwendig, um die Membran zu überwinden. An der Membran bildet sich ein Chemokingradient aus und migratorische Zellen überwinden

diese in Richtung ansteigender Konzentration (Abb. 11). Die Migrationzeit von 90 min wurde in Vorversuchen als optimal ermittelt. Kontrollansätze beinhalteten die 100 %-Kontrolle, bei der das Protokoll ohne Membran durchgeführt wurde, sodass alle eingesetzten Zellen als „migriert“ detektiert wurden. Dieser Wert galt als Referenzwert für die Berechnung des Anteils der migrierten Plasmablasten oder Plasmazellen an allen eingesetzten Plasmablasten und Plasmazellen. Die Basalmigrationsfrequenz gibt an, wie viele Zellen die Membran unabhängig von der Anwesenheit des Chemokins passieren („Hintergrundmigration“). Hierbei wurde das Versuchsprotokoll ohne die Zugabe des Chemokins durchgeführt. Der Chemokinesetest unterschied die gerichtete Migration entlang des Chemokingradienten von demjenigen Migrationsverhalten, welches zwar spezifisch durch das Chemokin verursacht wurde, jedoch nicht zwangsläufig entlang des Gradienten stattfand. Hier wurde der Gradient aufgehoben, indem das Chemokin in beide Kompartimente in identischer Konzentration zugegeben wurde.



**Abb. 11: Das *in vitro* Transmigrationsexperiment: schematischer Aufbau und Ablauf.**

Eine Zellkulturkavität wurde durch eine poröse Membran in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt. Oben wurde eine Zellsuspension eingesät, unten eine Chemokinlösung hinzugegeben. Nach 90 min Inkubation im Brutschrank wurden Anzahl bzw. Phänotyp der migrierten, aus dem unteren Kompartiment geernteten Zellen bestimmt.

### 3.6.2 Durchführung des *in vitro* Transmigrationsversuchs

Transwells (in einer Zellkulturplatte mit 24 Kavitäten,  $\varnothing$  6,5 mm, Porengröße 5  $\mu$ m, Corning Costar, Schiphol, Niederlande) wurden mit humanem Fibronektin beschichtet. Dazu wurden in jedem Transwell 100  $\mu$ l Fibronektinlösung (10  $\mu$ l/ml in Wasser, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 1 h bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und die Platte 2 h bei 37 °C getrocknet. Die unteren Kompartimente wurden mit je 600  $\mu$ l Migrationsmedium (RPMI 1640 mit 0,5 % BSA,



Biomol, Hamburg, Deutschland) mit oder ohne Chemokin (Tabelle 4) befüllt. In die oberen Kompartimente wurden je  $5 \times 10^5$  -  $2 \times 10^6$  PBMZ oder mononukleäre Zellen des Knochenmarks [129, 190] in je 100 µl RPMI 1640 gegeben. Die Präparation der Zellen fand bei Raumtemperatur und unter Verwendung vorgewärmten Zellkulturmediums anstelle gekühlter Puffer sowie ohne Anreicherung durch MACS/FACS und ohne die Verwendung präparativer Enzyme statt. Die Zellkulturplatten wurden dann 90 min bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (Migrationszeit). Anschließend wurden die Zellen aus den oberen und unteren Kompartimenten geerntet und mittels EliSpot oder Durchflusszytometrie quantifiziert bzw. phänotypisch charakterisiert.

**Tabelle 4: Chemokine, deren chemotaktische Wirkung auf Plasmablasten und Plasmazellen untersucht wurde.**

Optimale Chemokinkonzentrationen (jedoch höchsten 600 nM) wurden selbst bestimmt (ohne Abb.) oder auf der Grundlage publizierter Protokolle ermittelt [190, 222-224].

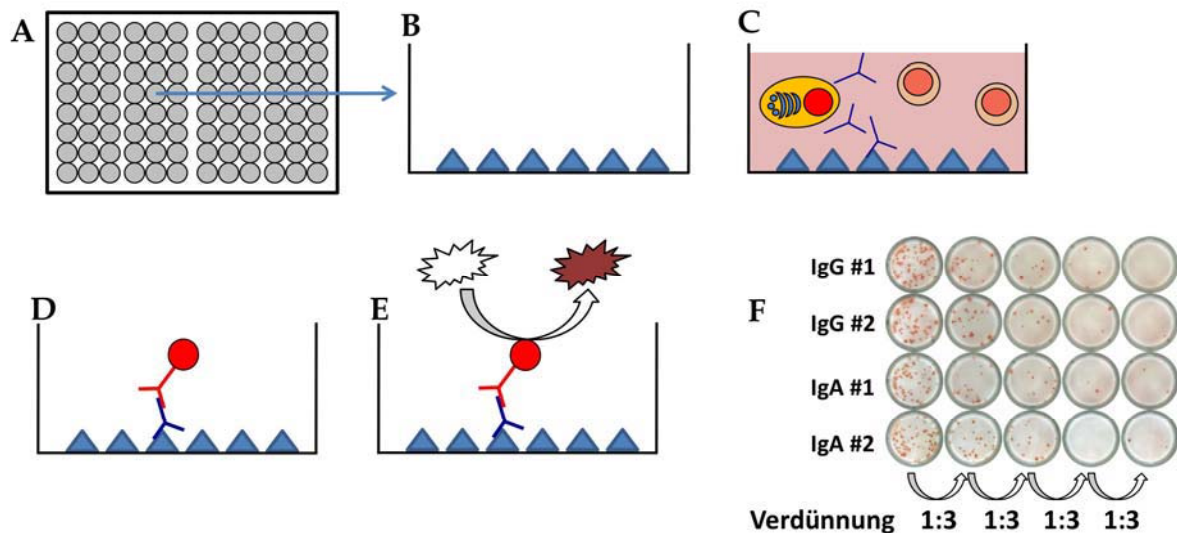
Systemische Nomenklatur	Alternative Bezeichnung	Konzentration	Rezeptor(en)	Herkunft
CXCL12	<i>Stromal-derived factor-1<math>\alpha</math></i> (SDF-1 $\alpha$ )	10 nM	CXCR4, (CXCR7)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland und Peprotech, Hamburg, Deutschland
CXCL9	<i>Monokine induced by interferon-<math>\gamma</math></i> (MIG)	100 nM	CXCR3	
CXCL10	<i>IFN-<math>\gamma</math>-inducible protein-10</i> (IP-10)	23 nM	CXCR3	
CXCL11	<i>IFN-<math>\alpha</math>-inducible T-cell-chemoattractant</i> (I-TAC)	600 nM	CXCR3	
CCL25	<i>Thymus expressed chemokine</i> (TECK), Ck $\beta$ -15	300 nM	CCR9	
CCL28	<i>Mucosae-associated epithelial chemokine</i> (MEC)	300 nM	CCR10	

### 3.7 Detektion von Plasmazellen mit Hilfe des EliSpot-Versuchs

#### 3.7.1 Versuchsprinzip des EliSpot-Assays

Das *enzyme-linked immunospot* (EliSpot)-Experiment ist eine sensitive immunologische Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Zellen, die in großer Menge lösliche Proteine absondern. Plasmablasten und Plasmazellen sezernieren kontinuierlich Antikörper und können anhand dieser Eigenschaft zuverlässig durch das EliSpot-Experiment detektiert werden (Abb. 12). Mithilfe des EliSpot werden ausschließlich funktionelle antikörpersezernierende Zellen erkannt, nicht aber nicht sezernierende, eventuell defekte oder apoptotische Plasmablasten

oder Plasmazellen. Andererseits können als *Spots* detektierte Plasmablasten und Plasmazellen nicht weiter charakterisiert werden. Durch die Wahl der Reagenzien können Isotyp und Reaktivität der sezernierten Antikörper bestimmt werden [225].



**Abb. 12: Prinzip des EliSpot-Verfahrens.**

In einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte (A) wurde Antigen oder immunglobulinspezifischer Antikörper (*Catch*) immobilisiert (B). Eine Zellsuspension wurde hinzugegeben und unter Zellkulturbedingungen inkubiert, sodass Plasmablasten und Plasmazellen, soweit vorhanden, Immunglobuline sezernieren konnten. Das sezernierte Immunglobulin wurde vom immobilisierten Antigen/Antikörper in der unmittelbaren Umgebung der sezernierenden Zelle gebunden (C). Die Zellsuspension wurde entfernt, die Platte gewaschen und die gebundenen Immunglobuline wurden mit einem spezifischen, enzymgebundenen Detektionsantikörper markiert (D). Die Visualisierung der Immunglobuline erfolgte durch Zugabe eines chromogenen Substrats, welches durch das Enzym umgesetzt wurde (E). Als Ergebnis entstanden farbige Punkte (*Spots*), von denen jeder eine sezernierende Zelle anzeigte (Beispiel in F). Diese wurden ausgezählt und gaben in Relation zur eingesetzten Zellmenge Aufschluss über die absolute Anzahl antikörpersezernierender Plasmablasten und Plasmazellen in einer Probe. Meist war die Anzahl der Plasmablasten und Plasmazellen in einer Probe unbekannt, sodass Verdünnungsreihen der PBMZ analysiert wurden, um eine optimale Auszählung zu gewährleisten. Als Beispiel ist hier die Detektion IgA- und IgG-sezernierender Plasmablasten und Plasmazellen im Doppelansatz in 1:3 Verdünnungsschritten dargestellt (F, Millipore-Protokoll).

### 3.7.2 Material, Chemikalien und Protokoll für das EliSpot-Verfahren

Im Verlauf dieser Arbeit wurde das Protokoll von einem agarosebasierten System auf ein membranbasiertes System umgestellt. Die Ergebnisse beider Protokolle wurden exemplarisch auf Übereinstimmung getestet und wiesen keine systematischen Unterschiede auf (ohne Abb.). Die analytspezifischen Reagenzien waren in beiden Protokollen identisch (Tabellen 6,7), während andere Materialien und Chemikalien ausgetauscht wurden (Tabelle 5). Alle Schritte des Protokolls, soweit nicht anders

angegeben, erfolgten bei Raumtemperatur.

**Tabelle 5: Laborausüstung und Material für EliSpot-Experimente.**

Aufgeführt sind Materialien für das Agarose-Protokoll (weiß), für beide Protokolle (hellgrau) und für das Millipore-Protokoll (dunkelgrau).

Bezeichnung	Spezifikation	Herkunft
Mikrowelle	1000 W	Siemens, München, Deutschland
Polyethylenfolie		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotiterplatten	flachbodig, hochbindend, Polystyrol, 96 well	Corning Costar, Corning, NY
AMP-Puffer	95 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP) 0,1 ml Triton X-405 150 mg/ml MgCl <sub>2</sub> 900 ml Aqua dest. Eingestellt auf pH 10,25 mit HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat 1 mg/ml in AMP-Puffer	
SA-AP	Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (0,33 U/ml in PBS/BSA/Tween 20)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Agarose	Typ I, geringe Elektroendoosmose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EliSpot Blockierungspuffer	PBS mit 3 % Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Elispot Waschpuffer	PBS mit 3 % BSA und 0,05 % Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Millipore Filterplatten	Multiscreen flat bottom 96 well	Millipore, Schwalbach, Deutschland
EtOH	35 % in ddH <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SA-HRP	Streptavidin - horseradish peroxidase - Konjugat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol	
DMF	N,N-Dimethylformamid	
Azetatpuffer	0,2 M Natriumazetat/0,2 M Essigsäure, pH 5	DRFZ, Berlin, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS/Tween-20	0,05 % Tween 20	DRFZ, Berlin, Deutschland
EliSpot-Lesegerät		CTL, Aalen, Deutschland
Immunospot Software		

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte bzw. Millipore-Filterplatte wurden mit 50 µl Antigen- bzw. Antikörperlösung (Tabelle 6) 1 h lang bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor der Beschichtung mit doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (dsDNA) wurde die Platte 3 h bei 37 °C mit Methyl-BSA

beschichtet. Die Lösung wurde entfernt, die Platte mit PBS gewaschen und anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert (100 µl Blockierungspuffer > 30 min). Nach einem Waschschrift mit PBS wurden 300 µl frisch gewaschener Zellsuspension mit einer zuvor bestimmten Zellzahl zugegeben. Als Kontrollen wurden Ansätze mit Medium ohne Zellen (Negativkontrolle) oder unter Zusatz von 5 µl geeigneten Blutserums (Positivkontrolle) befüllt. Die Platten wurden 3 h bei 37 °C in 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, die Zellen dann durch intensives Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Platten wurden exemplarisch mit dem Mikroskop auf die Abwesenheit von Zellen überprüft. Danach wurden jeweils 50 µl einer Lösung der biotinylierten Detektionsantikörper (Tabelle 7) hinzugegeben und 20 min inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit Elispot-Waschpuffer und die 20-minütige Inkubation mit SA-AP (Agarose) bzw. SA-HRP (Millipore). Nach dreimaligem Waschen wurden die Vertiefungen mit je 100 µl Entwicklungspuffer befüllt.

**Tabelle 6: Reagenzien zur Beschichtung der Mikrotiter- oder Filterplatten beim EliSpot-Experiment.**

Bezeichnung	Konzentration	Herkunft
Ziege-Anti-Mensch IgG	5 µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ziege-Anti-Mensch IgM		
Ziege-Anti-Mensch IgA		
Tetanustoxoid	21,5 LF/ml in PBS	Novartis Behring, Marburg, Deutschland
Hepatitis-B-Antigen	k. A.	zur Verfügung gestellt von Miltenyi BioTec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Tetanus C-Fragment	5 µg/ml in PBS	Hoffmann-LaRoche, Indianapolis, IN
DNA	10 µg/ml in PBS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Methyl-BSA	10 µg/ml in PBS, pH 7,2	

**Tabelle 7: Detektionsantikörper bei EliSpot-Experimenten.**

Bezeichnung	Endkonzentration	Herkunft
Biotinylierter Ziege-Anti-Mensch IgG	1 µg/ml in PBS/BSA/Tween	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Biotinylierter Ziege-Anti-Mensch IgM	2 µg/ml in PBS/BSA/Tween	
Biotinylierter Ziege-Anti-Mensch IgA		

Entwicklung Agarose: Eine 1 %-ige BCIP-Lösung in AMP-Puffer wurde 20 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert (4 Volumen), mit geschmolzener, 2 %-iger Agaroselösung (1 Volumen) versetzt und weitere 20 min bei 65 °C vermischt. Nach Zugabe in die Mikrotiterplatte wurden eventuell entstandene Blasen mit einer Kanüle zerstochen. Zur Verfestigung der Agarose und Entwicklung wurden die Platten

erschütterungsfrei 10 min bei 4 °C, dann 10 min bei Raumtemperatur und schließlich 3 h bei 37 °C inkubiert. Die blauen Spots wurden unter einem Invertmikroskop gezählt. Die Platten wurden zu Kontrollzwecken bis zu 1 Woche bei 4 °C in Polyethylenfolie gelagert.

Entwicklung Millipore: Eine AEC-Tablette wurde in 2 ml DMF gelöst und 1 ml dieser Lösung tropfenweise in 30 ml Azetatpuffer verdünnt. Nach der Filtration (0,22 µm) der AEC/DMF/Azetat-Lösung wurden 12 µl Wasserstoffperoxid je 22 ml Lösung hinzugegeben und unmittelbar danach jede Vertiefung der Mikrotiterplatte mit 100 µl des Gemischs 15 min im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde der Plastikboden der Filterplatte entfernt und die Platte intensiv mit gereinigtem, deionisiertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Die getrockneten Platten wurden bis zur Analyse am Elispot-Lesegerät maximal 3 Tage dunkel und trocken aufbewahrt.

### 3.8 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung in einer Suspension von Einzelzellen erfolgte entweder in einer Zählkammer oder mit Hilfe des CASY®-Gerätes (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland). Für beide Methoden wurde eine geeignete Verdünnung der Zellsuspension ermittelt und eingesetzt. Die Zählkammer (Neubauer-Kammer, Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde mit 10 µl der verdünnten Zellsuspension beschickt. In allen 4 Großquadraten wurden diejenigen Zellen unter einem Invertmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) gezählt, deren Morphologie auf lebende Lymphozyten schließen ließ. Die Zellzahl in der Suspension wurde folgendermaßen errechnet:

$$Z = (n_{GQ1} + n_{GQ2} + n_{GQ3} + n_{GQ4})/4 \times 10^4 \times Vf \times V.$$

Dabei stellte Z die Gesamtzellzahl in der eigentlichen Suspension dar,  $n_{GQx}$  die gezählte Zellanzahl in einem Großquadrat, Vf den Verdünnungsfaktor der Probensuspension und V das Gesamtvolumen der Probensuspension in Milliliter.

Die Zellquantifizierung mittels CASY-Gerät basiert darauf, dass Zellen den elektrischen Widerstand in einer Messlösung verändern. Die gemessene Widerstandsdifferenz korreliert dabei mit dem Volumen der Zelle. Das Gerät saugte 3 x 400 µl Probelösung (Triplikat) durch eine Messküvette, in der der elektrische Widerstand kontinuierlich gemessen wurde. Dadurch konnten Anzahl und Größe der

Zellen in der Probelösung berechnet werden.

Für einige Berechnungen wurden Lymphozytenzahlen aus der Routinediagnostik der Charité Universitätsmedizin Berlin verwendet (Labor Prof. Volk).

### **3.9 Nachweis in vitro sezernierter Immunglobuline**

#### **3.9.1 PBMZ-Kultur**

Zur Bestimmung der Menge und Spezifität der von Plasmablasten bzw. Plasmazellen gebildeten Immunglobuline wurden PBMZ und mononukleäre Zellen des Knochenmarks isoliert, zweimal in PBS/0,2 % BSA gewaschen, gezählt und in RPMI 1640/10 % FCS 2 Tage lang bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden nachfolgend abzentrifugiert und verworfen, die Überstände bei -20 °C eingefroren und bis zur Analyse gesammelt. Diese Überstände enthielten u. a. Antikörper, die spontan von Plasmablasten und Plasmazellen in der zuvor eingesäten Zellsuspension *in vitro* sezerniert wurden. 8 Proben stammten von PBMZ von 8 gesunden Kontrollprobanden, 37 Proben von PBMZ von 23 B-Zell-depletierten RA-Patienten (bei 10 Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten), 4 von Knochenmarkzellen von Patienten ohne immunologische Grunderkrankung und 3 Proben waren Leerkontrollen, bei denen keine Zellen eingesät worden waren.

#### **3.9.2 Prinzip und Durchführung des ELISA-Verfahrens**

Zur Analyse des Bindungsverhaltens der *in vitro* gebildeten Immunglobuline wurde das ELISA-Verfahren (*enzyme-linked immunosorbent assay*) angewendet. Es basiert auf denselben Prinzipien wie das oben beschriebene EliSpot-Verfahren. Bei der hier eingesetzten *Sandwich*-Versuchsanordnung wurde (Abb. 12) eine Mikrotiterplatte mit Antigen/Antikörper beschichtet, die Analytlösung hinzugegeben, inkubiert, die Platte gewaschen, mit einem enzymgekoppelten Detektionsantikörper inkubiert und durch Zugabe eines passenden chromogenen Substrats eine Farbreaktion in der Flüssigphase induziert. Die Intensität der Färbung nach einer festen Zeitspanne war abhängig von der Menge des in der Platte gebundenen Antikörper-Enzym-Konjugats, welche wiederum abhängig von der in der Probe vorhandenen Analytkonzentration war. Die Farbintensität wurde in einem Photometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) als optische Dichte (OD) bei geeigneter Wellenlänge bestimmt (405 nm oder 450 nm). Die Steuerung des Photometers sowie die Datenaufzeichnung und

-analyse erfolgte mittels SoftMaxPro Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Wenn möglich, wurden bekannte Verdünnungen des Analyten zur Erstellung einer Standardkurve benutzt, anhand derer absolute Mengen des Analyten in einer Probe bestimmt werden konnten.

Die Menge *in vitro* sezernierter IgG- und IgA-Rheumafaktoren wurde mit Hilfe entsprechender Kits unter Verwendung mitgelieferter Reagenzien und Protokolle bestimmt (Generic Assays, Dahlewitz, Deutschland). Exemplarisch wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, die Abweichungen von  $< \pm 3 \%$  des Durchschnittswertes zeigten.

Für die übrigen ELISA-Experimente wurden Mikrotiterplatten (Corning Costar, NY) über Nacht bei 4 °C mit den folgenden Antigenen (verdünnt in PBS) beschichtet: Tetanustoxoid (zur Verfügung gestellt von Novartis Behring, Marburg, Deutschland, 21,5 LF/ml), Lipopolysaccharide (LPS, von den *E. coli*-Stämmen 0111:B4, 055:B5, 026:B6, *Enterococcus ssp.*, *Porphyromonas gingivalis* und *Klebsiella pneumoniae*, insgesamt 42 µg/ml), PneumoVax (Sanofi Pasteur MSD, Leimen, Deutschland, enthält Pneumokokken-Polysaccharide der Typen 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F, insgesamt 10 µg/ml) und glutaraldehydfixierte *E. coli* und *Enterococcus faecalis* (zur Verfügung gestellt von Dr. Julia Benckert und Dr. Hedda Wardemann, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin,  $5 \times 10^7$  Zellen/Kavität). Nach 3-maligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20 (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden unspezifische Bindungsstellen mit PBS/0,05 % Tween 20/5 mM EDTA 1 h bei Raumtemperatur blockiert. 50 µl Probenlösung wurden 90 min bei 37 °C in den Platten inkubiert und danach durch 6-maliges Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20 gründlich entfernt. Zur Detektion gebundenen IgA-Antikörper wurde 1 h lang mit einem Ziege-Anti-human IgA-alkalische-Phosphatase-Konjugat bei Raumtemperatur inkubiert (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Großbritannien), welches wiederum durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween entfernt wurde. *P*-Nitrophenylphosphat (PnPP, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde in Ethanolaminpuffer (96 ml Ethanolamin, 50 mg  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (beide Sigma-Aldrich), add 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , eingestellt auf pH 9,8 mit HCl) gelöst (1 mg/ml) und als Substrat verwendet. Die Extinktion wurde bei 405 nm mit einem EMax Photometer (Molecular devices, Sunnyvale, CA) bestimmt. IgA aus humanem Kolostrum (2,5 µg/ml),

humanes Blutserum ohne IgA (31,5 mg/ml) (beide Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und zwei weitere Blutseren, eines davon gewonnen 7 Tage nach sekundärer Tetanusimmunisierung, wurden als Positiv- bzw. Negativkontrollen verwendet (ohne Abb.).

### 3.9.3 Die Multiplex-Analyse

Bei der Multiplex-Analyse zur Quantifizierung löslicher humaner IgA-Antikörper wurden entsprechend Herstellerangaben fluoreszente Partikel in einer Filter-Mikrotiterplatte mit IgA-spezifischem Antikörper beschichtet, gewaschen, mit der Probelösung koinkubiert, gewaschen, mit biotinyliertem Detektionsantikörper inkubiert, gewaschen, mit Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) inkubiert, gewaschen, resuspendiert und am Bio-Plex Gerät (BioRad, Hercules, CA) gemessen. Dabei wurden die fluoreszenten Partikel durch zwei Fluoreszenzdetektionskanäle erfasst und in einem dritten Kanal die Intensität der PE-Färbung als Korrelat der Analytkonzentration gemessen. Probenvorbereitung, Einrichtung und Kalibration des Bio-Plex-Geräts sowie die Durchführung des Experiments fanden gemäß Herstellerangaben unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten oder vorgeschlagenen Reagenzien statt (humanes Immunglobulinisotypisierungs-Kit, Kalibrationspartikel, Probenverdünnungspuffer, alle BioRad, Hercules, CA).

## **3.10 Abbildungen und statistische Auswertung**

Die Datenprozessierung, Berechnungen und Datendarstellungen wurden mit Microsoft Excel (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) und GraphPad Prism V4 (GraphPad software, San Diego, CA) durchgeführt. Für die graphischen Darstellung wurden weiterhin Photoshop (Adobe, Dublin, Irland) und Microsoft Powerpoint (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet. Für abhängige Grundgesamtheiten wurde der Wilcoxon Rangsummentest verwendet, sonst der Mann-Whitney-Test (beide doppelseitig mit 95 % Konfidenzintervall). Für statistische Korrelationsuntersuchungen wurde die Spearman-Analyse eingesetzt.



## 4 Ergebnisse

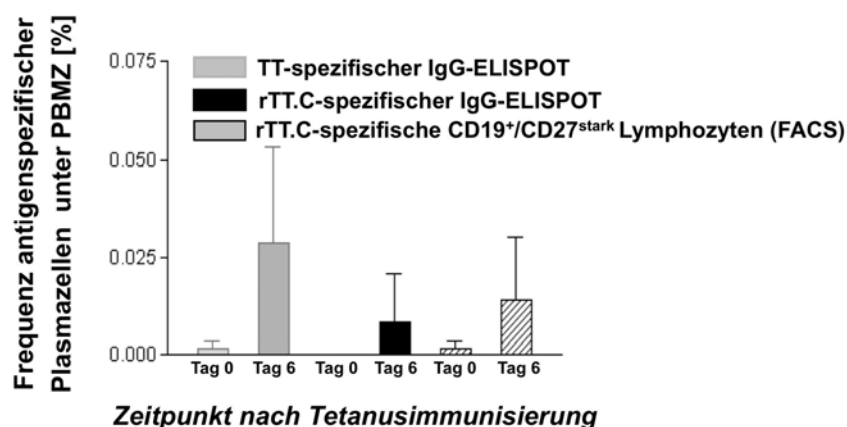
### 4.1 Charakteristika zirkulierender antikörpersezernierender Zellen nach sekundärer Tetanusimmunisierung

Impfungen mit Tetanustoxoid induzieren langfristig persistierende, protektive Antikörpertiter im Blutserum. Die experimentell bestimmte Halbwertszeit für Anti-Tetanus-IgG-Antikörpertiter liegt bei etwa 11 Jahren [114]. Durch Auffrischungsimpfungen mit Tetanustoxoid induzierte Plasmazellen werden hier als stellvertretend für Plasmazellen analysiert, die lang anhaltenden antigenspezifischen Serum-IgG-Titern zugrunde liegen. Die typische intramuskuläre Applikation von Tetanustoxoid im Rahmen einer Sekundärimmunisierung führt überwiegend zur Verarbeitung des Antigens in lokalen Lymphknoten. Dort werden B-Zellen, deren Antigenrezeptor (BZR) Tetanusantigen bindet, unter T-Zell-Hilfe und -Kostimulation aktiviert und zur Proliferation sowie zur Differenzierung zu Plasmablasten bzw. Gedächtnis-B-Zellen angeregt, die dann entweder im Gewebe verbleiben, in dem sie induziert wurden, oder in den Blutkreislauf entlassen werden.

#### 4.1.1 Detektion tetanusantigenspezifischer B-Zellen

Mit dem bereits etablierten Nachweis tetanusspezifischer Plasmazellen mittels EliSpot (z. B. [226]) war die simultane Analyse der Expression mehrerer Moleküle oder die Sortierung tetanusspezifischer B-Zellen nicht möglich. Daher wurde zur Charakterisierung der tetanusspezifischen sekundären Immunreaktion auf Ebene im Blut zirkulierender B-Zellen zunächst die durchflusszytometrische Detektion antigenspezifischer B-Zellen etabliert. Dazu wurden tetanusreaktive B-Zellen und Plasmablasten durch Bindung des fluorochrommarkierten Antigens (Tetanustoxoid, TT) oder Antigenfragments (rekombinantes Tetanustoxin C-Fragment, rTT.C) durchflusszytometrisch visualisiert (Abb. 7A, 15A). Dies ermöglichte die Multiparameteranalyse antigenspezifischer B-Zellen und Plasmablasten und ggf. deren physische Separation mittels FACS. Die Zuverlässigkeit des durchflusszytometrischen Nachweisverfahrens wurde durch simultane EliSpot-Experimente bestätigt (Abb. 13) und dessen Spezifität durch Blockierungsexperimente mit ungekoppeltem Antigen belegt (Abb. 7C).

Die Detektion mittels rTT.C zeigte etwa ein Drittel aller Tetanustoxoid (TT) bindenden B-Zellen an: 33 - 40 % der antigenspezifischen Plasmablasten zwischen Tag 5 und 8 nach Immunisierung sowie 22 - 36 % der antigenspezifischen Gedächtnis-B-Zellen ab Tag 9 nach Immunisierung (Abb. 15A). Die Verwendung des rTT.C als Detektionsantigen lieferte ein optimales Signal/Hintergrundsignal-Verhältnis und eine verlässliche, spezifische durchflusszytometrische Separation im Messkanal für die Antigenspezifität (Abb. 15A). In allen weiteren FACS-Experimenten wurde daher rTT.C für die antigenspezifische B-Zell-Detektion verwendet.

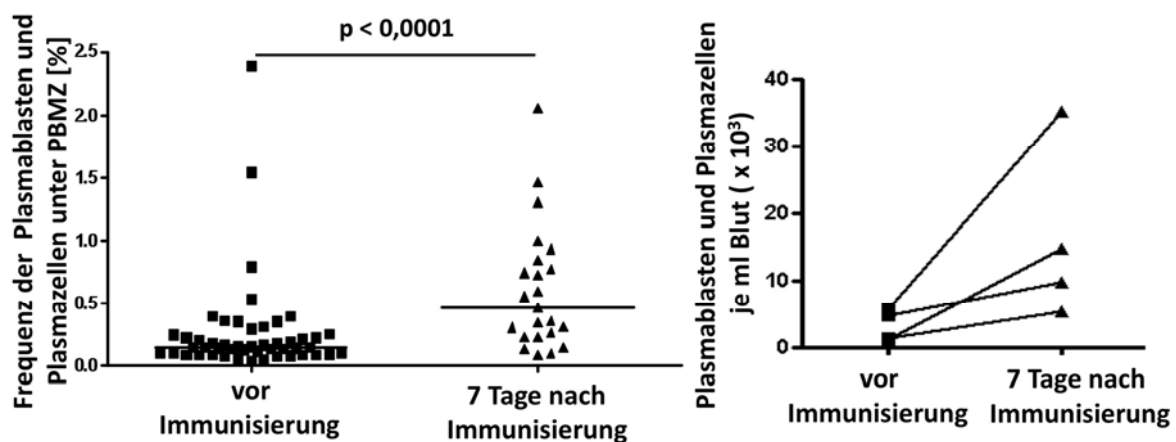


**Abb. 13: Vergleich von FACS und EliSpot-Verfahren zur Detektion tetanusspezifischer Plasmablasten und Plasmazellen.**

PBMZ wurden vor und 6 Tage nach einer sekundären Immunisierung mit Tetanustoxoid isoliert (15 Probanden) und die Frequenzen TT- oder rTT.C-spezifischer antikörpersezernierender Zellen durch EliSpot und FACS parallel bestimmt. Vor der Immunisierung betrug die Frequenz tetanustoxoidspezifischer antikörpersezernierender Zellen unter den PBMZ  $0,0017 \pm 0,005$  % (Bereich, 0,005 - 0,077 %) und die der rTT.C-spezifischen PBMZ (FACS)  $0,001 \pm 0,0015$  % (0,001 - 0,006 %). 6 Tage nach der Immunisierung lagen beide Frequenzen erhöht vor: es wurden  $0,029 \pm 0,025$  % (0,013 - 0,188 %) tetanustoxoidspezifische antikörpersezernierende Zellen unter den PBMZ bzw.  $0,014 \pm 0,016$  % (0,001 - 0,05 %) rTT.C-spezifische PBMZ per FACS detektiert. Die mittels beider Methoden gewonnenen Ergebnisse (rTT.C-spezifische PBMZ per FACS und per EliSpot) korrelierten signifikant ( $r = 0,8237$ ;  $p < 0,0001$ ) und demonstrieren die Vergleichbarkeit der Resultate beider Messmethoden. Ein vergleichbarer Validierungsansatz wurde inzwischen auch für die Detektion weiterer Antigenspezifitäten bei B-Zellen angewandt [227].

#### 4.1.2 Anzahl und Kinetik antigenspezifischer Plasmablasten nach sekundärer Tetanusimmunisierung

Nach sekundärer Immunisierung mit Tetanustoxoid wurde bei allen untersuchten Probanden ein Anstieg der Frequenz der Plasmablasten und Plasmazellen im peripheren Blut am Tag 6 - 8 nach Immunisierung nachgewiesen (Abb. 14, 15, 19). Vor der Immunisierung betrug die Frequenz der Plasmablasten und Plasmazellen unter den PBMZ  $0,14 \pm 0,39\%$  (Median und Standardabweichung), bei teilweise hoher interindividueller Varianz unter den 49 getesteten Probanden (0,03 - 2,39 %). 6 bis 7 Tage nach Immunisierung lag diese Frequenz mit  $0,46 \pm 0,50\%$  signifikant erhöht vor ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney-Test, 23 Probanden, 0,008 - 2,06 %). Die absolute Anzahl der Plasmablasten und Plasmazellen im peripheren Blut unter Gleichgewichtsbedingungen (vor Immunisierung) betrug  $2.307 \pm 657/\text{ml}$  (19 Probanden). 7 Tage nach der Immunisierung konnten bis zu 35.200 Plasmablasten und Plasmazellen je Milliliter nachgewiesen werden (Abb. 14). Bei allen Probanden, bei denen absolute Zellzahlen vor und nach Immunisierung erhoben wurden, war die Anzahl der Plasmablasten und Plasmazellen nach der Immunisierung höher als davor (Abb. 14).

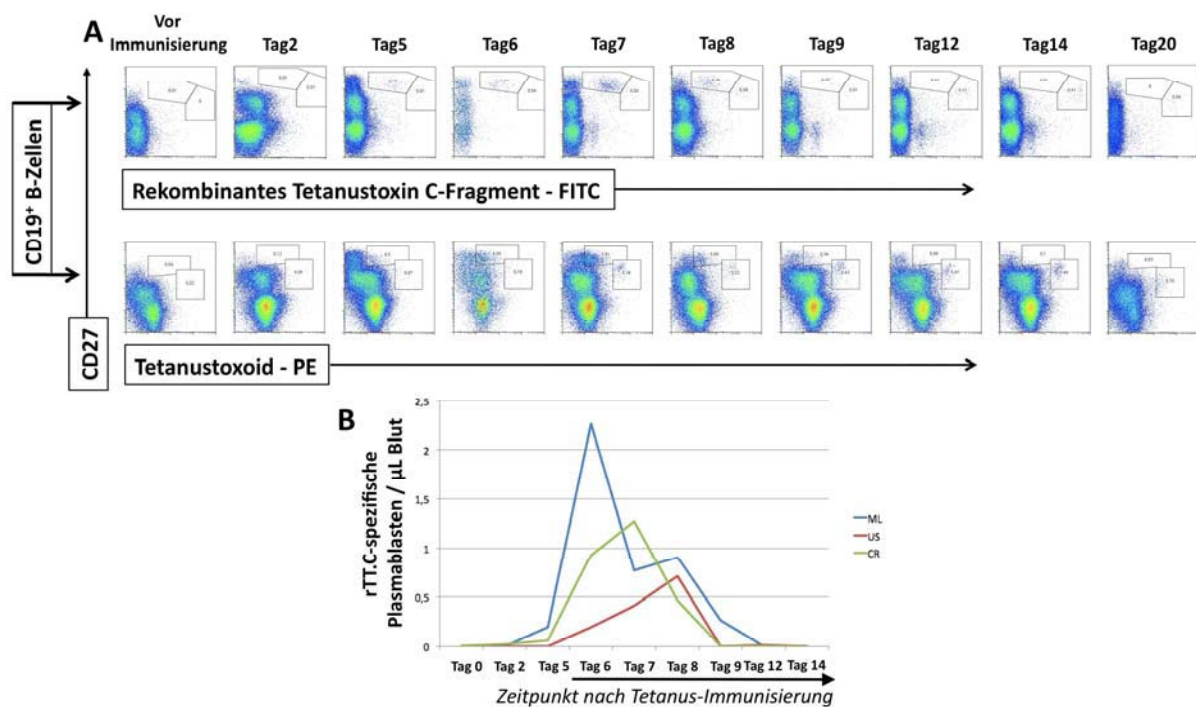


**Abb. 14: Signifikante Erhöhung der Frequenz und der absoluten Anzahl von Plasmablasten und Plasmazellen des peripheren Blutes 7 Tage nach sekundärer Tetanusimmunisierung.**

Die absolute Anzahl und/oder die Frequenz von Plasmablasten und Plasmazellen unter PBMZ wurde vor bzw. nach sekundärer Immunisierung mit Tetanustoxoid durchflusszytometrisch erfasst, wie in Kapitel 3 beschrieben.

Vor der Immunisierung waren keine oder sehr wenige antigenspezifische rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten im Blut nachweisbar. Inwieweit diese tatsächlich antigenspezifische Zellen darstellen, bleibt unklar, da die entsprechenden Messwerte nahe an der Sensitivitätsgrenze der verwendeten Detektionsverfahren lagen

(1 in mindestens  $10^5$  PBMZ). 6 - 7 Tage nach Immunisierung lag der Anteil der rTT.C-spezifischen Plasmablasten unter allen Plasmablasten und Plasmazellen bei durchschnittlich 9,7 % (4,6 - 19,3 %, 13 Probanden). Bei 3 Probanden wurde die genaue Kinetik antigenspezifischer Plasmablasten nach Immunisierung erhoben. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abb. 13 wurde bei 2 Probanden 6 - 7 Tage nach Immunisierung die maximale Frequenz und Anzahl TT-spezifischer Plasmablasten innerhalb des Messzeitraums von 21 Tagen detektiert. Bei einem Probanden wurde diese Maximalfrequenz am Tag 8 nach Immunisierung beobachtet (Abb. 15B). An den Tagen vor und infolge der maximalen Frequenz antigenspezifischer Plasmablasten wurden dieselben ebenfalls nachgewiesen, bei bis zu 10-mal geringerer Frequenz.



**Abb. 15. Kinetik rTT.C- und TT-bindender B-Zellen des peripheren Blutes nach sekundärer Tetanusimmunisierung.**

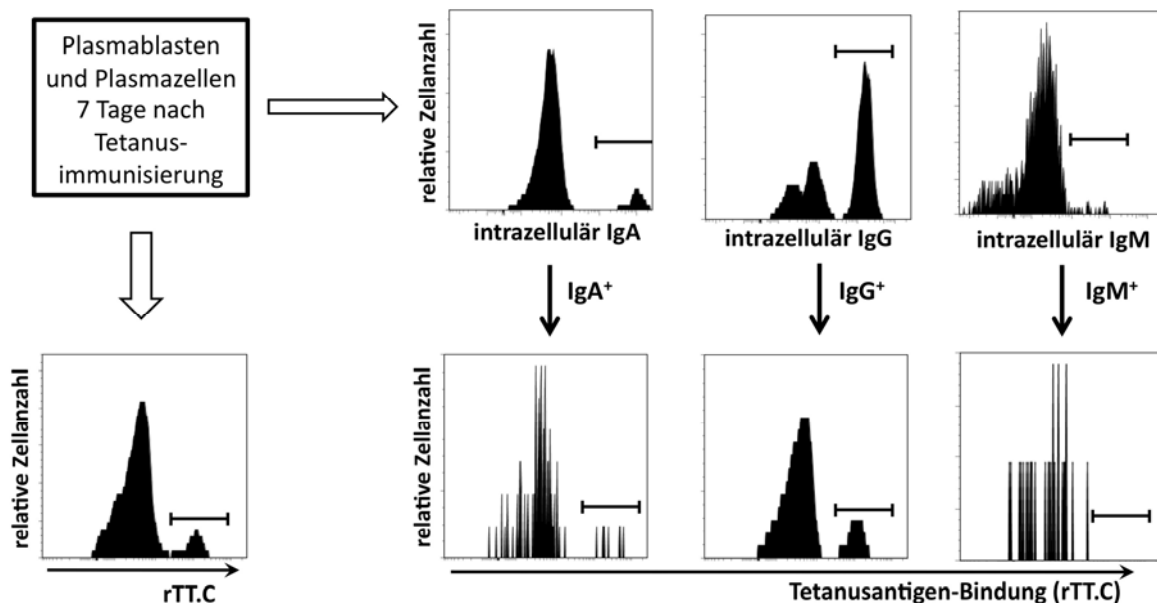
(A) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden PBMZ von TT-immunisierten Probanden isoliert. TT- und rTT.C-bindende Zellen sind mit ihrer Frequenz unter den gesamten CD19<sup>+</sup> B-Zellen dargestellt. Stellvertretend wird die Kinetik eines von drei Probanden gezeigt. (B) Dargestellt ist die Kinetik der absoluten Anzahl rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten aller drei getesteten Probanden.

Nach der Tetanusimmunisierung wurden neben antigenspezifischen CD19<sup>+</sup>/rTTC<sup>reduziert</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten (mit schwacher Expression des rTT.C-bindenden B-Zell-Rezeptors) auch tetanusantigenbindende rTT.C<sup>stark</sup>/CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen (mit starker Oberflächenexpression des

rTT.C-bindenden B-Zell-Rezeptors) identifiziert. Im Vergleich zu rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten lagen antigenspezifische Gedächtnis-B-Zellen in etwa 10-fach geringerer (Maximal-) Frequenz bezogen auf CD19<sup>+</sup> B-Zellen vor und konnten vermutlich deshalb nicht bei allen Probanden zuverlässig nachgewiesen werden. Sie traten ab dem 8. - 9. Tag nach der Immunisierung (Abb. 15A) im Blut auf und konnten teilweise noch 34 Tage nach Immunisierung nachgewiesen werden [152].

#### 4.1.3 Der Phänotyp antigenspezifischer Plasmablasten im peripheren Blut nach Tetanusimmunisierung

Übereinstimmend mit ihrer Fähigkeit, Immunglobuline zu synthetisieren und zu sezernieren, wurde die intrazelluläre Expression von Immunglobulinen bei Plasmazellen und Plasmablasten einschließlich antigenspezifischer Plasmablasten 7 Tage nach Immunisierung nachgewiesen (Abb. 7A, 16). Periphere Plasmablasten sezernierten nach sekundärer Tetanusimmunisierung am häufigsten IgG (Median 69,1 %, 32,9 - 88,0 %). Dies traf insbesondere auf antigenspezifische Zellen zu (93,1 %, 35,1 - 100,0 %) (Abb. 16). Innerhalb der kleineren Fraktion IgA-sezernierender Zellen (22,9 %, 8,1 - 55,9%) konnten 7 Tage nach Tetanusimmunisierung bei 16 von 19 Probanden auch antigenspezifische Plasmablasten nachgewiesen werden. Im Durchschnitt exprimierten 6,9 % (0,0 - 61,0 %) der antigenspezifischen Plasmablasten IgA. IgM wurde selten von Plasmablasten oder Plasmazellen exprimiert: 7 Tage nach Immunisierung waren 7,8 % (1,2 - 20,0 %) intrazellulär IgM<sup>+</sup>, wobei lediglich bei 7/19 Probanden rTT.C<sup>+</sup>/izIgM<sup>+</sup> Plasmablasten nachgewiesen werden konnten (Median 0 %, maximal 28 %). Da die Messwerte nahe der Nachweisgrenze lagen, konnten tetanusspezifischer IgM<sup>+</sup> Plasmablasten nicht endgültig belegt bzw. ausgeschlossen werden.

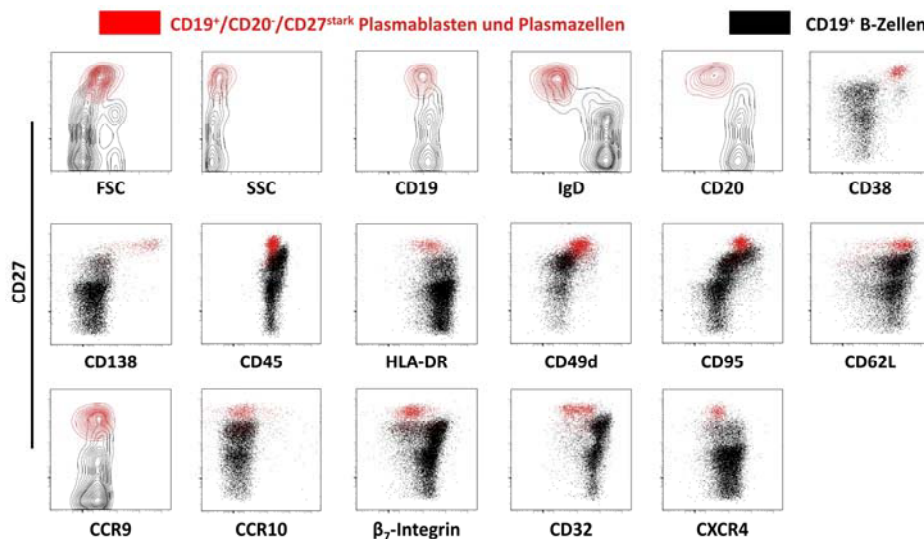


**Abb. 16: Antigenspezifische Plasmablasten exprimieren intrazelluläres Immunglobulin G.**

7 Tage nach einer sekundären Tetanusimmunisierung wurden PBMZ durchflusszytometrisch auf ihren Gehalt an antigenspezifischen Plasmablasten und Plasmazellen und die intrazelluläre Expression von IgG, IgA und IgM hin untersucht. Dargestellt wird eine exemplarische Analyse eines der insgesamt 19 Probanden. Vorherige, unabhängige Analysen (Abb. 7A) bestätigend, betrug die Frequenz der antigenspezifischen rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten unter allen Plasmablasten und Plasmazellen hier 12,8 % (Median, 1,4 - 25,8 %), was einem Median der absoluten Zellzahl von 266/ml (40 - 1.145/ml) entsprach. Darunter waren durchschnittlich (Median) 9 IgA<sup>+</sup>/rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten/ml (0 - 471/ml), 252 IgG<sup>+</sup>/rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten (23 - 1.108/ml) und 0 IgM<sup>+</sup>/rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten (0 - 11/ml).

7 Tage nach einer sekundären Tetanusimmunisierung wurden Plasmablasten und Plasmazellen im peripheren Blut auf die Expression von Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern sowie von Molekülen der Zelladhäsion und -migration analysiert. In Abb. 17 sind phänotypische Charakteristika von CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen (rot) im Vergleich zu anderen peripheren CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+/-</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen (schwarz) dargestellt. Die Population der Plasmablasten und Plasmazellen war hinsichtlich der Zellgröße (FSC, Vorwärtsstreulicht) und Zellgranularität (SSC, Seitwärtsstreulicht) homogen, wobei sie stets höhere FSC-Signale als CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+/-</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen aufwies, sich aber kaum in ihrer Granularität (SSC) von den CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+/-</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen unterschied. Plasmablasten und Plasmazellen waren weiterhin durch das Expressionsprofil ihrer Differenzierungs- und Aktivierungsmarker CD19<sup>+(reduziert)</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD45<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>/CD38<sup>sehr stark</sup>/CD138<sup>+/-</sup>/HLA-DR<sup>+/-</sup>/CD95<sup>stark/sehr stark</sup>/CD32<sup>schwach</sup> charakterisiert und unterschieden sich somit von

simultan analysierten CD20-exprimierenden B-Zellen (Abb. 17). Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren wurden bei Plasmablasten und Plasmazellen heterogen exprimiert. Plasmablasten und Plasmazellen im Blut tetanusimmunisierter Probanden exprimierten den Phänotyp  $CCR9^-/CCR10^{+/-}/CD49d^{+}/CXCR4^{schwach}/CD62L^{+/-}/\beta_7\text{-Integrin}^{+/-}$ . Weiterhin wurde nach Formaldehydfixierung und Zellmembranpermeabilisierung mittels Saponin die starke intrazelluläre Expression des hypothetischen Plasmazellmarkers Wue-1 [228] nachgewiesen (ohne Abb.), wodurch die zuverlässige Detektion antikörpersezernierender Zellen durch einen unabhängigen Marker bestätigt wurde. Der ebenfalls intrazellulär lokalisierte Proliferationsmarker Ki-67 wurde auf Plasmablasten gegenüber Plasmazellen infolge einer Tetanusimmunisierung differentiell exprimiert (Abb. 22C,D).

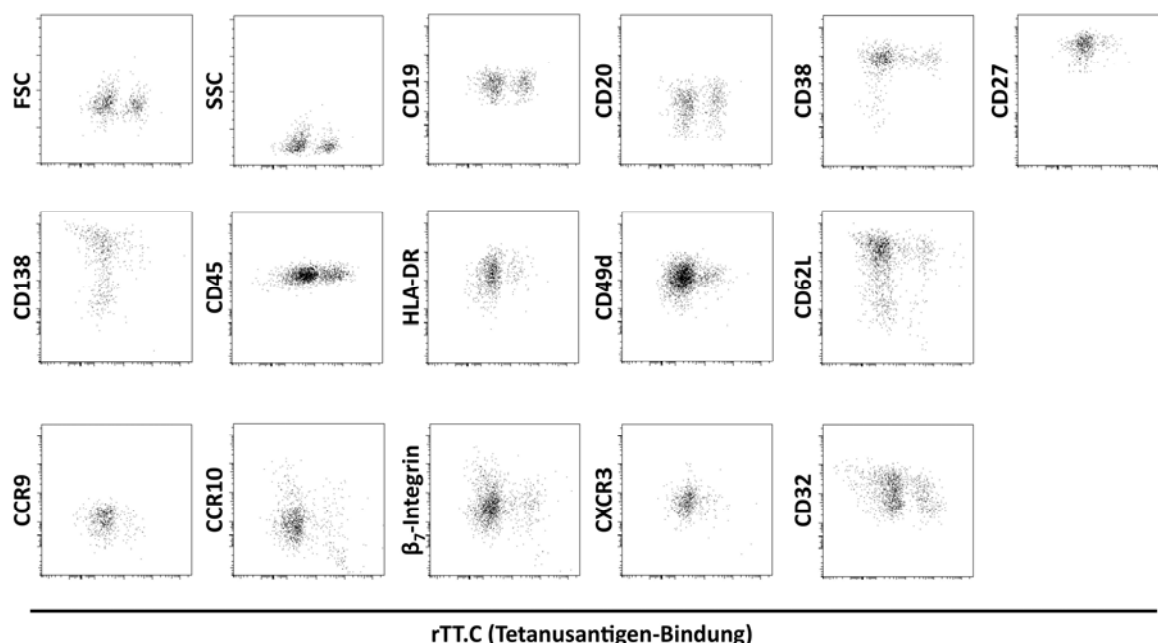


**Abb. 17: Phänotypisierung von B-Zellen des peripheren Blutes 7 Tage nach Tetanusimmunisierung.**

7 Tage nach einer Sekundärimmunisierung mit Tetanustoxoid wurden PBMZ durchflusszytometrisch auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und ihre Streulichteigenschaften hin untersucht.  $CD19^+$  B-Zellen wurden elektronisch zur weiteren Analyse ausgewählt (schwarz) und hier dargestellt, wobei CD27 stets auf der Y-Achse zur grundsätzlichen Unterscheidung naiver B-Zellen ( $CD27^-$ ), Gedächtnis-B-Zellen ( $CD27^+$ ) [229] sowie Plasmablasten und Plasmazellen ( $CD27^{stark}/CD20^-$ , rot) dargestellt wurde (Abb. 9A). Dabei handelt es sich um eine kumulative Zusammenstellung von Daten aus verschiedenen Experimenten, sodass die dargestellte (technische) Streubreite des CD27-Signals variiert. Jede Abbildung steht für mindestens 2 Analysen unterschiedlicher Probanden.

Zusammenfassend wurde für Plasmablasten und Plasmazellen eine heterogene Expression der Differenzierungsmarker CD138, CD95 und HLA-DR, der Adhäsionsmoleküle CD62L und  $\beta_7$ -Integrin sowie des Chemokinrezeptors CCR10

belegt (Abb. 17).



**Abb. 18: Phänotypisierung tetanusspezifischer Plasmablasten 7 Tage nach Tetanusimmunisierung.**

7 Tage nach Sekundärimmunisierung mit Tetanustoxoid wurden  $CD19^+/CD27^{\text{stark}}/CD20^-$  Plasmablasten und Plasmazellen des Blutes durchflusszytometrisch erfasst, elektronisch zur Analyse ausgewählt und auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und ihre Streulichteigenschaften hin untersucht. Die Darstellungen vergleichen die Expression jeweils eines Moleküls oder einer Streulichteigenschaft zwischen rTT.C-bindenden Plasmablasten und rTT.C-nicht-bindenden Plasmablasten und Plasmazellen. Jede Abbildung steht für mindestens 2 Analysen unterschiedlicher Probanden.

7 Tage nach Tetanusimmunisierung wurden stets antigenspezifische Plasmablasten im Blut der Probanden nachgewiesen (Abb. 7A, 13, 15, 16, 18, 19A). Das typische Expressionsprofil tetanusspezifischer Plasmablasten ist in Abb. 18 dargestellt. Tetanusspezifische Plasmablasten, analysiert 7 Tage nach der Immunisierung, exprimierten homogen den distinktiven Phänotyp  $CD138^+/HLA-DR^{\text{stark}}/CD62L^+/\beta_7\text{-Integrin}^-/Ki-67^+/CCR10^-$ , wobei andere Plasmablasten sowie Plasmazellen diese Marker differentiell exprimierten. Bei den übrigen erfassten Oberflächenmolekülen und Streulichtparametern (FSC, SSC, CD19, CD20, CD38, CXCR3, CCR9, CD32, CD45, CD27, CD49d) konnte auf Proteinebene keine unterschiedliche Expression zwischen rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten und rTT.C<sup>-</sup> Plasmablasten sowie Plasmazellen festgestellt werden.



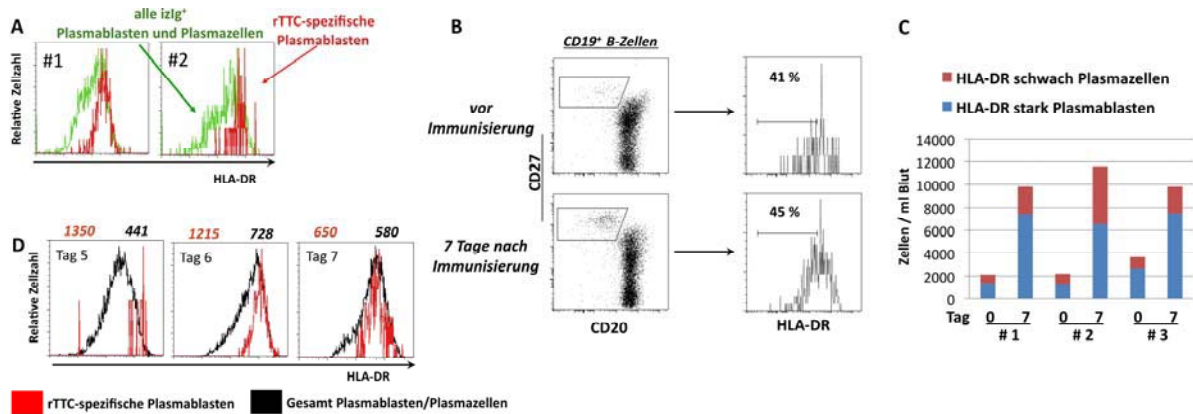
#### 4.1.4 Charakteristisch für antigenspezifische Plasmablasten 6 - 7 Tage nach Tetanusimmunisierung ist die starke Expression von HLA-DR

Die differentielle Expression von HLA-DR auf Plasmablasten gegenüber Plasmazellen nach Immunisierung erschien geeignet, um verschiedene Plasmazelldifferenzierungsstadien zu untersuchen, und zwar aus drei Gründen.

- I) Die Expression von HLA-DR wird im Verlauf der Plasmazelldifferenzierung negativ reguliert [50].
- II) Nahezu alle rTTC<sup>+</sup> Plasmablasten zeigten 7 Tage nach Immunisierung eine starke HLA-DR - Expression (Abb. 19A).
- III) Die starke Expression von HLA-DR ging mit der Expression des Zellproliferationsmarkers Ki-67 einher, einer typischen Eigenschaft erst kürzlich generierter bzw. differenzierter Plasmablasten [159] (Abb. 22C,D).

Eine starke HLA-DR - Expression wurde somit als charakteristisch für kürzlich generierte Plasmablasten identifiziert und erlaubte die Definition zweier Subpopulationen unter den CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Lymphozyten: HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten und HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen (Abb. 19B,C, 22A,D, 31A,C).

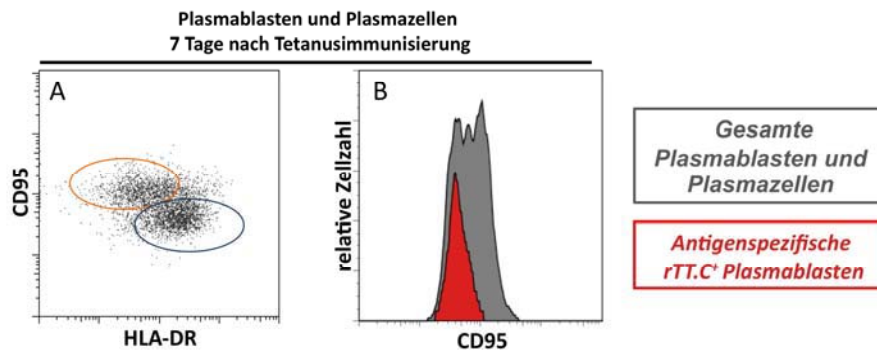
Die Expression von HLA-DR als Marker von Plasmablasten wurde nun genutzt, um Plasmablasten detaillierter zu untersuchen. So wurde festgestellt, dass die Expressionsstärke von HLA-DR auf antigenspezifischen Plasmablasten *in vivo* mit der Zeit nach Immunisierung sukzessive abnimmt, sodass die starke HLA-DR - Expression als Charakteristikum antigenspezifischer Plasmablasten auf „frühe“ Plasmablasten, etwa 6 bis maximal 7 Tage nach Immunisierung beschränkt blieb. Während 5 Tage nach der Immunisierung bei Plasmablasten ein etwa 3-fach stärkeres HLA-DR - Signal nachgewiesen wurde als simultan bei allen Plasmablasten und Plasmazellen, war es einen Tag später, zum Zeitpunkt der höchsten Frequenz antigenspezifischer Plasmablasten im Blut, noch 1,7-fach so stark, und bei abfallender Frequenz dieser Zellen 2 Tage später 1,1-fach so stark (Abb. 19D).



**Abb. 19: HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten und HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen befinden sich vor und 7 Tage nach sekundärer Tetanusimmunisierung in einem stöchiometrischen Gleichgewicht.**

(A) 7 Tage nach einer Tetanusimmunisierung wurde HLA-DR stark auf antigenspezifischen Plasmablasten exprimiert. Unter den HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen wurden keine bzw. höchstens einzelne antigenspezifische Zellen identifiziert. Stellvertretend ist das Ergebnis von 2 Probanden dargestellt, bei denen Plasmablasten und Plasmazellen (grün) sowie rTTC<sup>+</sup> Plasmablasten (rot), wie in Abb. 7A angegeben, eingegrenzt wurden. (B + C) Die HLA-DR - Expression auf CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen wurde vor und 7 Tage nach einer Tetanusimmunisierung bei 3 Probanden analysiert. (B) Das relative Verhältnis zwischen HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten und HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen blieb bei 3,5-facher Erhöhung der Gesamtfrequenz CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Lymphozyten im Vergleich zum Zustand vor Immunisierung stabil. (C) Das Verhältnis der absoluten Anzahl von HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten und HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen blieb bei 3/3 Probanden unter Immunisierungsbedingungen stabil. (D) Dargestellt ist die Kinetik der HLA-DR - Expression auf antigenspezifischen Plasmablasten, stellvertretend für 2 unabhängige Experimente. Zu Beginn des Auftretens antigenspezifischer Plasmablasten im Blut des immunisierten Probanden war die Expression von HLA-DR auf den wenigen detektierten antigenspezifischen Zellen im Vergleich zur Gesamtpopulation sehr stark. Im weiteren Zeitverlauf nahm die HLA-DR - Expression bei antigenspezifischen Plasmablasten ab. Am Tag 6 nach der Immunisierung, zum Zeitpunkt der maximalen Frequenz antigenspezifischer Plasmablasten, ist der Unterschied noch deutlich sichtbar, während am Tag 7 nach Immunisierung, im vorliegenden Beispiel bei schon abnehmender Frequenz der antigenspezifischen Plasmablasten, die durchschnittliche Fluoreszenzintensität nahezu der der Gesamtpopulation entsprach (rote und schwarze Zahlen, MFI, geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität).

Funktionell spiegelte sich die Verschiedenheit von HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten und HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen in ihrer Proliferationsaktivität, *in vitro* Migrationsfähigkeit (4.1.5) und der Expression von CD95, eines Rezeptors potentieller Apoptoseinduktion bei Plasmazellen, wider [141]. Antigenspezifische Plasmablasten wiesen eine zu anderen Plasmablasten und Plasmazellen relativ verringerte CD95-Expression auf. Plasmazellen mit niedriger Expression von HLA-DR zeigten hingegen eine etwa 5-fach stärkere Expression von CD95 (Abb. 20). Die Proliferation von Plasmablasten wurde durch die intrazelluläre Expression von Ki-67 angezeigt, welches korrelierend mit der starken HLA-DR - Expression nur bei Plasmablasten, nicht aber bei Plasmazellen exprimiert wurde (Abb. 22D).



**Abb. 20: Antigenspezifische HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten exprimieren schwächer CD95 als HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen.**

7 Tage nach einer sekundären Tetanusimmunisierung wurden Plasmablasten und Plasmazellen durchflusszytometrisch identifiziert und simultan auf die Expression von HLA-DR und CD95 getestet. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 4 analysierte Probanden. (A) Die geringe HLA-DR - Expression der Plasmazellen korrelierte mit einer hohen Expression von CD95 (orange markiert, Plasmablasten blau markiert). (B) In Übereinstimmung damit wiesen antigenspezifische Plasmablasten (mit starker Expression von HLA-DR, Abb. 19) eine schwache Expression von CD95 auf.

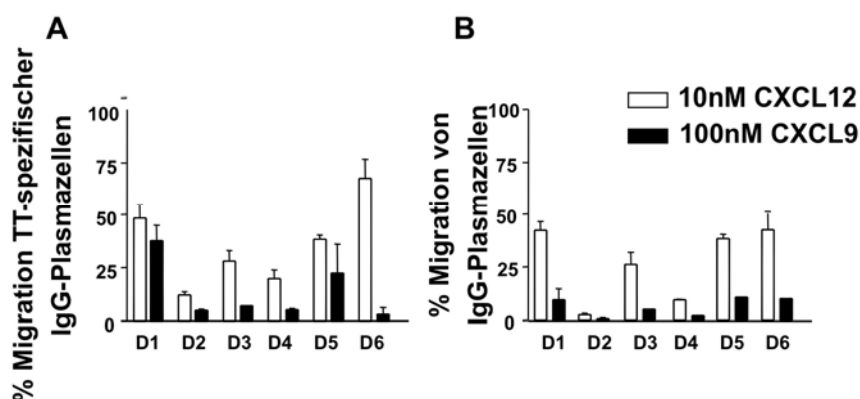
#### 4.1.5 Antigenspezifische Plasmablasten migrieren *in vitro* gegen CXCL9 und CXCL12

In *in vitro* Transmigrationsversuchen wurde das Migrationspotential von Plasmablasten und Plasmazellen für das Chemokin CXCL12 (10 nM) getestet. *In vivo* erlaubt die Migration entlang von Konzentrationsgradienten von CXCL12 die regelrechte Wanderung von frischen Plasmablasten in das Knochenmark und ist hinreichend für die lokale Akkumulation von Plasmablasten im Gewebe [129, 200, 201]. Folglich migrierten 7 Tage nach Tetanusimmunisierung nur frische HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten *in vitro* gegen CXCL12, während HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen in denselben Proben nicht migrierten (Abb. 31C). Der Phänotyp der gegen CXCL12 migrierten Plasmablasten entsprach überdies demjenigen kürzlich generierter, antigenspezifischer Plasmablasten nach Tetanusimmunisierung: sie exprimierten CD27<sup>stark</sup>/HLA-DR<sup>stark</sup>/CD62L<sup>+</sup>/β<sub>7</sub>-Integrin<sup>-</sup>/Ki-67<sup>+</sup>/CD138<sup>+/-</sup>. Dies belegt ein differentielles Zellmigrationsverhalten von Plasmablasten gegenüber Plasmazellen *in vitro*.

7 Tage nach Tetanusimmunisierung betrug die Frequenz der gegen 10 nM CXCL12 migrierten IgG-sezernierenden Plasmablasten  $26,9 \pm 17,3 \%$  und die der tetanusspezifischen IgG-sezernierenden Plasmablasten  $35,8 \pm 20,3 \%$ . In einer

unabhängigen Versuchsreihe mit durchflusszytometrischer Detektion aller Plasmablasten und Plasmazellen wurde dieses Ergebnis bestätigt (Abb. 30A), wobei IgG<sup>+</sup> Plasmablasten effizienter wanderten als andere (Abb. 22).

In Tierversuchen wurde zuvor CXCL9 (zusammen mit CXCL10 und CXCL11) als weiteres Schlüsselchemokin für die Migration von Plasmazellen identifiziert [129]. CXCL9 und CXCL10 werden im Rahmen von Entzündungen stark exprimiert und können CXCR3-exprimierende Plasmablasten in entzündeten Geweben attrahieren (Hoyer, Panne, Hiepe et al., Manuskript eingereicht und [78, 144, 205, 230, 231]. Die Exposition von PBMZ mit 100 nM CXCL9 führte zur Transmigration von  $6,4 \pm 4,4$  % der IgG-sezernierenden Zellen und  $13,5 \pm 13,8$  % der tetanusspezifischen IgG-sezernierenden Zellen (Abb. 21).



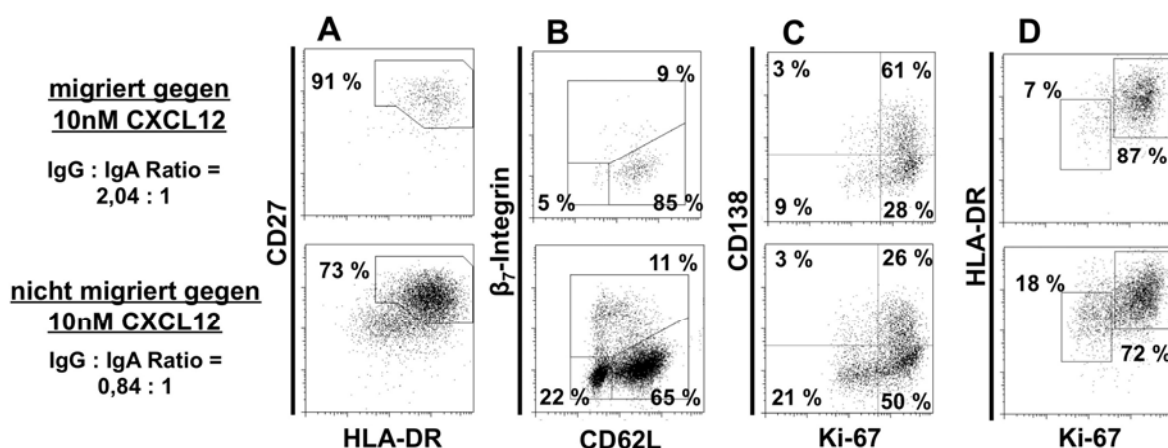
**Abb. 21: In vitro Migrationsverhalten IgG-sezernierender Zellen und tetanusspezifischer IgG-sezernierender Zellen.**

7 Tage nach einer sekundären Tetanusimmunisierung wurden PBMZ isoliert und in ein Transmigrationsexperiment eingesät. Getestet wurde die Migration gegen Konzentrationsgradienten von 10 nM CXCL12 (Ligand des Chemokinrezeptors CXCR4) und 100 nM CXCL9 (Ligand von CXCR3). Nach 90 min Inkubation im Brutschrank wurden migrierte Zellen sowie Zellen aus Kontrollansätzen ohne Membranbarriere geerntet und unter ihnen IgG-sezernierende Zellen (B) oder Anti-tetanustoxoid-IgG-sezernierende Zellen (A) durch das EliSpot-Verfahren quantifiziert. Aus diesen Messwerten wurde der Anteil migrierter Zellen für ein bestimmtes Chemokin berechnet. Dabei wurde die Frequenz der unspezifischen Basalmigration (3.6.1) abgezogen, welche durch die „Migration“ gegen 0,5 % Rinderserumalbumin ermittelt wurde und stets < 5 % der eingesäten IgG-sezernierenden Zellen betrug. Diese Experimente wurden im Doppelansatz durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 6 Probanden.

Die Migration zirkulierender Plasmablasten gegen CXCL12 wurde in späteren Experimenten mit durchflusszytometrischer Detektion aller migrierten CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten, nicht nur der IgG-sezernierenden, bestätigt. In diesen Versuchen wanderten 7 Tage nach Immunisierung  $15 \pm 13$  % aller

Plasmablasten/Plasmazellen gegen CXCL12 (10 Probanden), wobei die Basalmigration höchstens 2 % betrug. 7 Tage nach Tetanusimmunisierung wanderten IgG-exprimierende Plasmablasten effizienter als simultan (und in geringer Frequenz) nachweisbare IgA<sup>+</sup> Plasmablasten (Abb. 22).

Bei 2/2 getesteten Probanden konnte nach Tetanusimmunisierung keine Migration von Plasmablasten gegen den *in vivo* im Dünndarmgewebe exprimierten CCR9-Liganden CCL25 (300 nM) festgestellt werden [192, 193] (Abb. 30B). In Übereinstimmung damit wurde der intestinale Chemokinrezeptor CCR9, aber auch der pan-mukosale Chemokinrezeptor CCR10 nicht auf der Zelloberfläche tetanusspezifischer Plasmablasten exprimiert. Im Einklang mit früheren Experimenten in der Maus wurde bei migratorischen Plasmablasten eine schwache Oberflächenexpression der respektiven Chemokinrezeptoren, CXCR4 für CXCL12 und CXCR3 für CXCL9, CXCL10 und CXCL11, festgestellt (Abb. 17, 18) [152].



**Abb. 22: Der Phänotyp gegen CXCL12 migrierter Plasmablasten.**

7 Tage nach sekundärer Tetanusimmunisierung wurden PBMZ isoliert und in ein Transmigrationsexperiment mit 10 nM CXCL12 eingesetzt. Nach 90 min Migrationszeit wurden migrierte und nicht migrierte Zellen geerntet und unter ihnen durchflusszytometrisch izIg<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen identifiziert (3.5.3). Der Phänotyp gegen CXCL12 migrierter izIg<sup>+</sup> Plasmablasten war CD27<sup>stark</sup>/HLA-DR<sup>stark</sup> (A,D), CD62L<sup>+</sup>/β7-Integrin<sup>-</sup> (B), Ki-67<sup>+</sup>/CD138<sup>+</sup> (C,D). IzIgG<sup>+</sup> Plasmablasten lagen im Verhältnis zu izIgA<sup>+</sup> Plasmablasten in der migrierten Zellfraktion angereichert vor. Dargestellt ist eine repräsentative Analyse von 2 Experimenten.

### 4.1.6 Stöchiometrische Mobilisierung reifer HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen im Rahmen einer systemischen Immunantwort

Zusammengefasst bestanden antikörpersezernierende Zellen 7 Tage nach der Immunisierung mit Tetanustoxoid aus zwei funktionell unterschiedlichen Populationen:

- i) den antigenspezifischen, aus kürzlich aktivierten B-Zellen generierten, CD95<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>stark</sup>, proliferierenden, migratorischen Plasmablasten und
- ii) reifen, CD95<sup>++</sup>/HLA-DR<sup>schwach</sup>, nicht proliferierenden, nicht migratorischen Plasmazellen, die nicht spezifisch für das Impfantigen Tetanustoxoid waren.

Beide Populationen standen zueinander in einem stöchiometrischen Gleichgewicht: wurden zirkulierende Plasmablasten, einschließlich antigenspezifischer Plasmablasten, durch eine Tetanusimmunisierung induziert, traten gleichzeitig und im selben Maße vermehrt HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen mit dem Phänotyp reifer Plasmazellen auf (Abb. 19C).

Analog dazu wurde das stabile Zahlenverhältnis von Plasmablasten gegenüber Plasmazellen auch unabhängig von der Impfreaktion nachgewiesen, und zwar

- i) im immunologischen Gleichgewichtszustand, der durch eine sehr geringe Frequenz zirkulierender Plasmablasten und Plasmazellen mit mukosalen Charakteristika dominiert wird (Abb. 19B, 31A,C, Kapitel 4.2), und
- ii) im Zustand nochmals deutlich verringerter Plasmablastenproduktion während der therapeutischen B-Zell-Depletion mit dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab (Abb. 36 und 38A,B, Tabelle 8).

Analog zur Situation nach Tetanusimmunisierung spiegelt die starke Expression von HLA-DR sehr wahrscheinlich die kürzliche Induktion dieser Plasmablasten sowohl im Gleichgewichtszustand als auch unter B-Zell-Depletion wider (4.3). Im immunologischen Gleichgewicht koexprimierten HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten Ki-67 sowie die Adhäsionsmoleküle CD62L oder  $\beta_7$ -Integrin. Bei HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen wurde simultan keine adäquate Expression dieser Moleküle nachgewiesen. Damit ähnelte der Phänotyp zirkulierender HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen dem von reifen Plasmazellen, die zum Vergleich aus humanem Knochenmark isoliert wurden (4.2.5). Plasmazellen des menschlichen

Knochenmarks waren HLA-DR<sup>schwach</sup>/Ki-67<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>/β<sub>7</sub>-Integrin<sup>+/-</sup> (Abb. 31A,B).

#### 4.1.7 Die Spezifität antikörpersezernierender Zellen des Blutes 7 Tage nach sekundärer Tetanusimmunisierung

In Übereinstimmung mit vorherigen Arbeiten [56, 154, 232-235] waren die meisten zirkulierenden Plasmablasten nach einer Immunisierung spezifisch für das Impfantigen. Hier betrug die durchschnittliche Frequenz rTT.C-bindender Plasmablasten 9,7 - 12,8 % (Abb. 7A, 16) und der Anteil der Immunogenität des rTT.C am gesamten Tetanustoxoid etwa 25 - 40 %. Somit waren etwa 40 % der gesamten IgG<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen spezifisch für Tetanustoxoid. Die übrigen Plasmablasten waren vermutlich spezifisch für einen weiteren Bestandteil des Impfstoffs, das Diphtherietoxoid. Somit waren die meisten, wenn nicht alle HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten 6 - 7 Tage nach sekundärer Tetanusimmunisierung spezifisch für den Impfstoff und wurden gezielt als Reaktion auf diesen erzeugt. Die Antigenspezifität der gleichzeitig zirkulierenden HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen und die der nicht TT-reaktiven Plasmablasten blieb unaufgeklärt. In einem identischen Immunisierungsprotokoll wie dem hier verwendeten wurden sehr wenige antikörpersezernierende Zellen verschiedener Spezifitäten nachgewiesen (*Toxoplasma gondii*, Masern), die das Repertoire des humoralen Gedächtnisses widerspiegeln [56]. Ob es sich dabei um Plasmablasten oder Plasmazellen handelte, wurde nicht bestimmt. Hier wurden PBMZ nach Tetanusimmunisierung auf die Anwesenheit von Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg)-spezifischer und dsDNA-spezifischer IgG-sezernierender Zellen überprüft. Letztere konnten bei keinem der 10 getesteten gesunden Probanden (unter 10<sup>6</sup> PBMZ) detektiert werden. Bei 4 dieser 10 Probanden wurden in 10<sup>6</sup> PBMZ keine HBsAg-spezifischen IgG-sezernierenden Zellen gefunden, während bei 2/5 weiteren Probanden je 7 solcher Zellen unter jeweils 10<sup>7</sup> PBMZ detektiert wurden (ohne Abb.). Im Vergleich zur Frequenz tetanustoxoidspezifischer IgG-sezernierender Zellen war die Frequenz der HBsAg-spezifischen IgG-sezernierenden Zellen etwa 100-mal geringer. In Kontrollansätzen mit Albumin (BSA) als Antigen anstelle von HBsAg oder Tetanustoxoid wurde stets ≤ 1 Spot je 10<sup>6</sup> oder 10<sup>7</sup> PBMZ detektiert.

## **4.2 Charakteristika zirkulierender antikörpersezernierender Zellen im Gleichgewichtszustand**

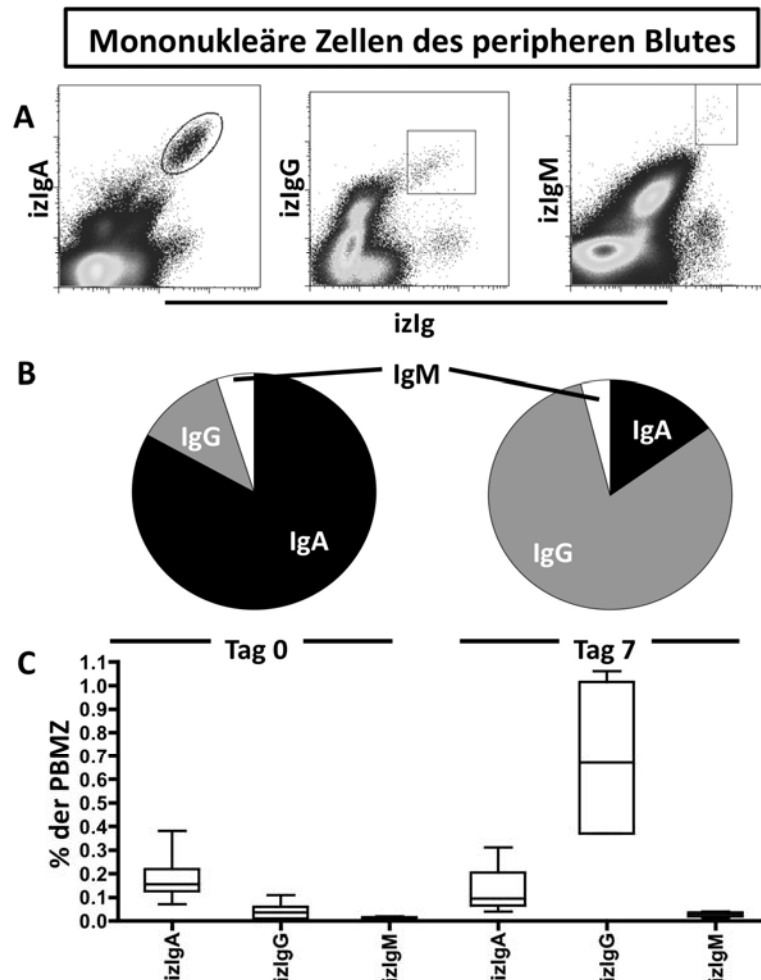
Im Gegensatz zum Zustand nach Tetanusimmunisierung waren ohne vorherige Immunisierung keine TT-reaktiven Plasmablasten oder Plasmazellen im Blut nachweisbar (Abb. 13, 28A), jedoch stets und bei allen gesunden Probanden andere antikörpersezernierende Zellen unbekannter Spezifität (Abb. 14, 15, 23A,C). Ihre Eigenschaften, ihr Differenzierungsstadium (Plasmablasten vs. Plasmazellen), ihre Herkunft und ihr Migrationsziel sowie ihre damit zusammenhängende Beziehung zu den Plasmazellen des humoralen Gedächtnisses waren unklar. Daher wurden hier die antikörpersezernierenden Zellen des peripheren Blutes im Gleichgewichtszustand, hinsichtlich ihrer Frequenz und Anzahl, ihres Isotyps, Phänotyps und *in vitro* Migrationsverhaltens analysiert.

### **4.2.1 Plasmablasten und Plasmazellen des Gleichgewichtszustandes exprimieren IgA, CCR10 und $\beta_7$ -Integrin**

Im Gleichgewichtszustand waren bei allen Probanden im Blut Plasmablasten und Plasmazellen in geringer Anzahl und Frequenz auffindbar (Abb. 14, 15A, 17, 19B, 23A,C, 24A). Die Analyse der von diesen Zellen exprimierten Immunglobuline ergab, dass 84 % (Median, Bereich, 60 - 92 %) dieser Zellen intrazelluläres IgA (izIgA) exprimierten, weitere 12 % (1 - 38 %) intrazelluläres IgG (izIgG) und 5 % (1 - 10 %) intrazelluläres IgM (izIgM) (8 Probanden, Abb. 23A,B). Die sekundäre systemische Immunisierung mit Tetanustoxoid führte zu einer deutlichen prozentualen Erhöhung der Frequenz der izIgG<sup>+</sup> Zellen 7 Tage nach Immunisierung (4 Probanden, Median 81 %, 73 - 90 %) mit einhergehender prozentualer Verringerung der izIgA<sup>+</sup> Zellen (15 %, 8 - 24 %) und izIgM<sup>+</sup> Zellen (4 %, 1 - 8 %). Vor der Immunisierung betrug der Anteil von izIgA<sup>+</sup> Zellen an den PBMZ 0,16 % (Median, 0,07 - 0,38 %), der von izIgG<sup>+</sup> Zellen 0,04 % (0,00 - 0,11 %) und der von izIgM<sup>+</sup> Zellen 0,01 % (0,00 - 0,02 %). 7 Tage nach der Immunisierung blieb die Frequenz der izIgA<sup>+</sup> und izIgM<sup>+</sup> Zellen unter PBMZ im Vergleich zum normalen Ausgangszustand vor Immunisierung konstant (izIgA<sup>+</sup> 0,10 %, 0,04 - 0,31 %,  $p = 0,283$ ; izIgM<sup>+</sup> 0,03 %, 0,01 - 0,04 %,  $p = 0,049$ ), während die Frequenz der izIgG<sup>+</sup> Zellen 10-fach erhöht vorlag (0,67 %, 0,37 - 1,06 %,  $p = 0,004$ ). Somit passierte im zeitlichen Verlauf nach der Immunisierung eine Welle



izIgG<sup>+</sup> Plasmablasten das Blut, unter ihnen antigenspezifische Plasmablasten, wobei die Anzahl der izIgA<sup>+</sup> Plasmablasten/Plasmazellen stabil blieb (Abb. 23C). Der Nachweis der IgA-Expression bei > 80 % der Plasmablasten und Plasmazellen legte deren mukosale Herkunft nahe, die durch die Analyse der Expression mukosaler Adhäsions- und Migrationsrezeptoren näher bestimmt wurde.



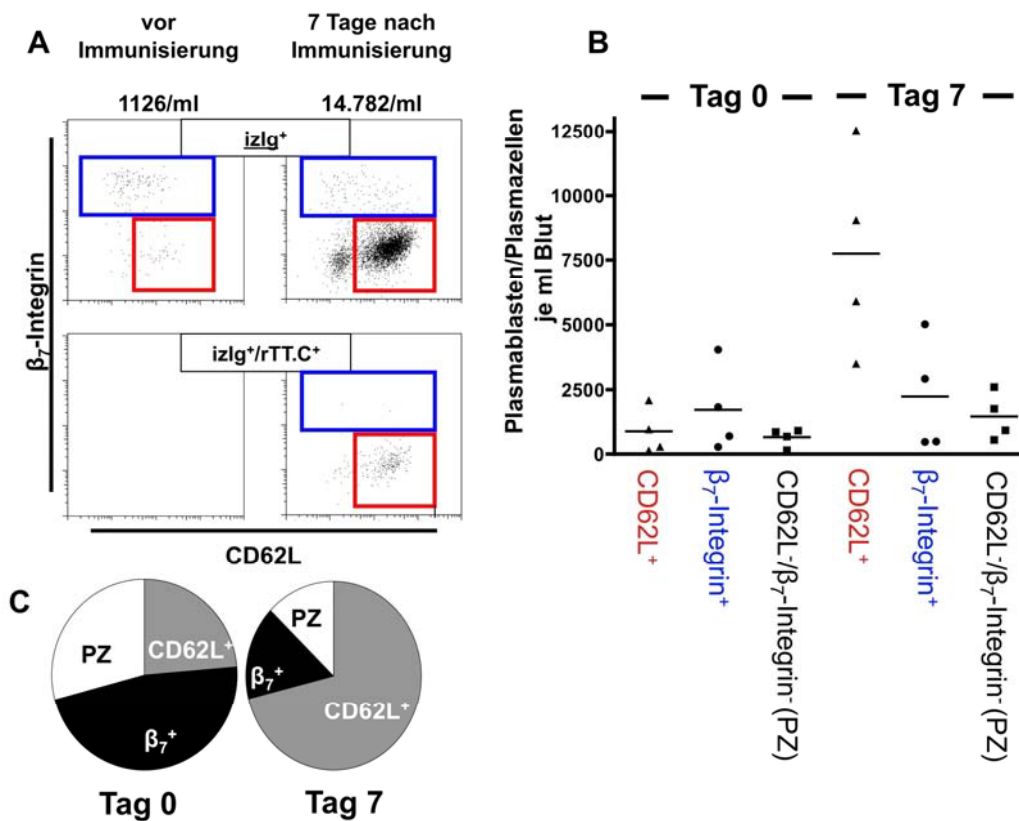
**Abb. 23: Plasmablasten und Plasmazellen aus dem Blut gesunder Probanden im immunologischen Gleichgewicht exprimieren mehrheitlich IgA und bleiben von einer Sekundärimmunisierung mit Tetanustoxoid in ihrer Frequenz im peripheren Blut unbeeinflusst.**

(A) Durchflusszytometrische Detektion von izIgA<sup>+</sup>, izIgG<sup>+</sup> und izIgM<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen unter PBMZ. (B) Relative Zusammensetzung der Plasmablasten und Plasmazellen des peripheren Blutes aus IgG-, IgA- und IgM-exprimierenden Plasmablasten und Plasmazellen vor und 7 Tage nach Tetanusimmunisierung.

Plasmablasten des peripheren Blutes im Gleichgewichtszustand exprimierten  $\beta_7$ -Integrin (Abb. 24A,B,C). Die Expression dieses Adhäsionsmoleküls ermöglicht zusammen mit der bei Plasmablasten und Plasmazellen regulären CD49d - Expression ( $\alpha_4$ -Integrin) als Heterodimer die Bindung dieser Zellen an

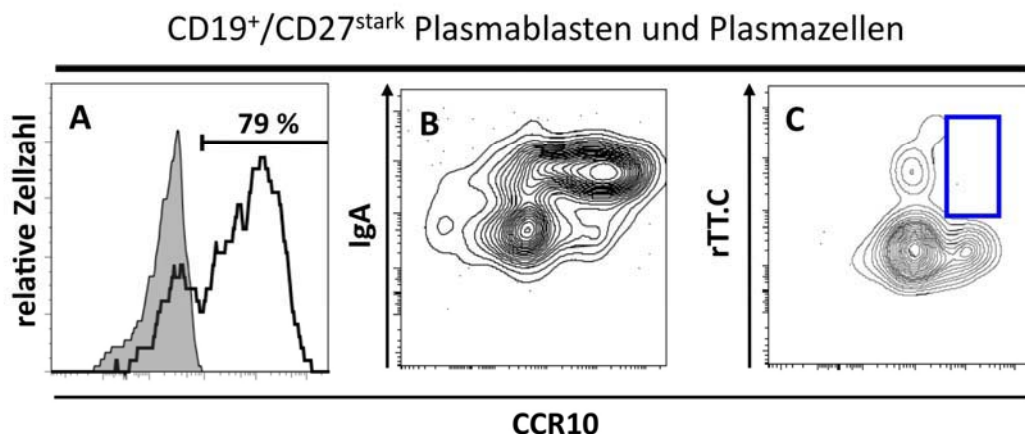
MadCAM-1 *in vivo* [176-178, 236, 237]. MadCAM-1 wird vor allem auf dem Gefäßendothel mukosaler Gewebe exprimiert [175] und allein die Wechselwirkung des  $\alpha_4\beta_7$ -Integrins mit MadCAM-1 gilt als ausreichend für die Etablierung einer festen Bindung zwischen Zellen und mukosalem Gefäßendothel im Blutstrom [186]. Somit erfüllen  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup> Plasmablasten eine wichtige Bedingung für die Immigration in mukosale Gewebe.  $31,7 \pm 23,1$  % der Plasmablasten und Plasmazellen des Blutes im Gleichgewichtszustand exprimierten  $\beta_7$ -Integrin (7 - 95 %, 29 Probanden). Nach parenteraler Immunisierung mit Tetanustoxoid blieb die Anzahl peripherer  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup> Plasmablasten stabil (1.259/ml vor und 1.702/ml nach Immunisierung), während die Anzahl  $\beta_7$ -Integrin nicht exprimierender Plasmablasten und Plasmazellen 7 Tage nach Immunisierung signifikant erhöht vorlag (Median 1.393/ml vor und 8.814/ml nach Immunisierung, Abb. 24B). Immunisierungsinduzierte rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten exprimierten kein  $\beta_7$ -Integrin. Konsistent mit ihrer Induktion in den peripheren Lymphknoten exprimierten jedoch fast alle den Lymphknotenmarker CD62L (L-Selektin) (Abb. 24A). Durch die Wechselwirkung mit verschiedenen auf dem Gefäßendothel exprimierten Glykoproteinen, zusammengefasst als *peripheral lymph node addressin* (PNAd), können CD62L<sup>+</sup> Leukozyten an das Gefäßendothel binden [165]. Insgesamt waren 7 Tage nach der Immunisierung 69 % aller peripheren Plasmablasten/Plasmazellen im Blut CD62L<sup>+</sup> (54 - 88 %).

Außerdem wurde der mukosale Chemokinrezeptor *C-C-motif-receptor 10* (CCR10) auf den Plasmablasten und Plasmazellen des Gleichgewichtszustands nachgewiesen (hohe Expression bei  $56 \pm 19$  %, Bereich 16 - 79 %, sonst niedrige Expression, 7 Probanden) (Abb. 25A,B, 26). Dieser Rezeptor wird funktionell auf Lymphozyten in den mukosalen Atemwegsgeweben, dem Darm, den Milchdrüsen und der Haut exprimiert [187, 190, 191, 238, 239]. Die gleichzeitige Analyse der IgA-Expression belegte die quantitative Korrelation der IgA-Expression mit der CCR10-Expression, wie durch die unterschiedlich starke Fluoreszenzintensität der CCR10-Färbung auf IgA<sup>+</sup> und IgA<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen deutlich wurde: IgA<sup>+</sup>,  $12.407 \pm 1.905$ , 10.127 - 14.327 gegenüber IgA<sup>-</sup>,  $4.438 \pm 1.932$ , 2.834 - 6.996,  $p = 0,0286$ , 4 Probanden) (Abb. 25B).



**Abb. 24: Differentielle Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L und  $\beta_7$ -Integrin auf Plasmablasten und Plasmazellen des peripheren Blutes in Abhängigkeit von systemischer Immunaktivierung durch Tetanusimmunisierung.**

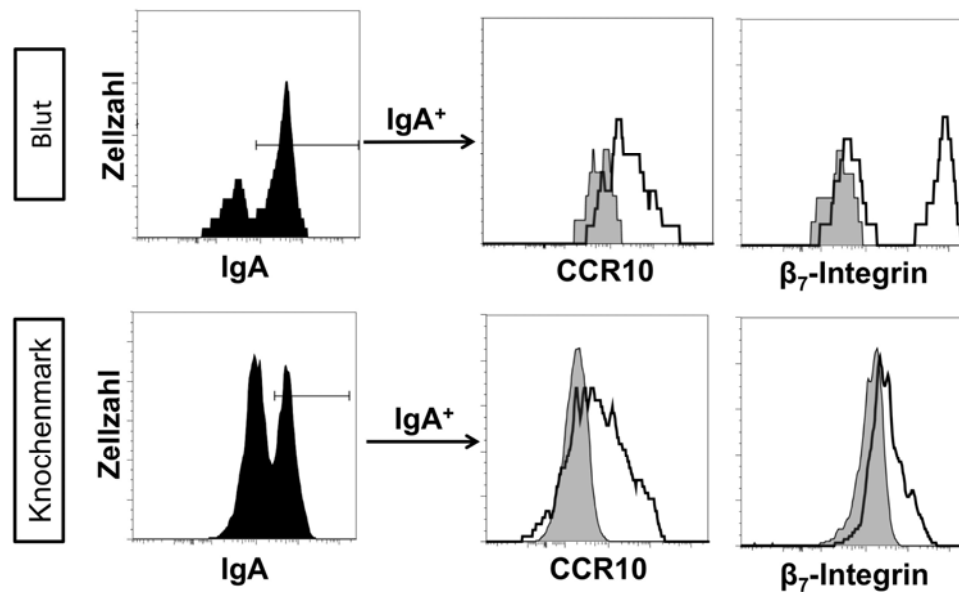
(A) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von  $\beta_7$ -Integrin und CD62L auf izlg<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen eines Probanden vor und 7 Tage nach einer sekundären Tetanusimmunisierung. Vor der Immunisierung war die Anzahl der Plasmablasten und Plasmazellen im Blut gering, und die Mehrheit dieser Zellen exprimierte  $\beta_7$ -Integrin (blaue Box). 7 Tage nach der Immunisierung waren unter einer etwa 10-fach erhöhten Gesamtanzahl der peripheren Plasmablasten und Plasmazellen des Blutes rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten nachweisbar. Diese antigenspezifischen Plasmablasten exprimierten den Lymphknotenadhäsionsmarker CD62L (rote Box), jedoch nicht  $\beta_7$ -Integrin. Somit war die Frequenz der  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen nach Immunisierung niedriger, während die der CD62L<sup>+</sup> Plasmablasten erhöht vorlag (B). Die Analyse absoluter Zellzahlen belegte eine anzahlmäßige Persistenz der  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup> Plasmablasten, die von einer Welle tetanusinduzierter CD62L<sup>+</sup> Plasmablasten überlagert wurde (C).



**Abb. 25: Nachweis der starken Expression von CCR10 bei Plasmablasten und Plasmazellen des peripheren Blutes im immunologischen Gleichgewichtszustand, nicht jedoch bei antigenspezifische Plasmablasten nach Tetanusimmunisierung.**

(A) Durchflusszytometrische Detektion des CCR10-Moleküls auf peripheren Plasmablasten und Plasmazellen (schwarz: Anti-CCR10, grau: Isotypkontrolle). (B) Korrelation der CCR10-Expression mit der Expression von IgA auf Plasmablasten und Plasmazellen. (C) 7 Tage nach Tetanusimmunisierung wurde CCR10 nicht von rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten exprimiert.

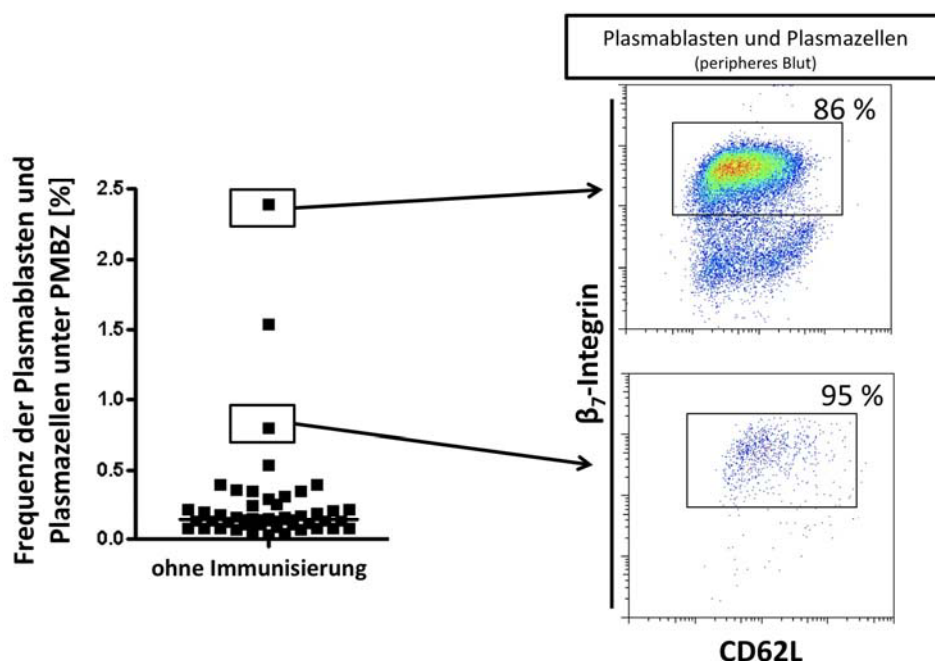
Die gleichzeitige Expression von IgA, CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin wurde sowohl für einen Teil der IgA<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen aus dem Blut als auch für IgA<sup>+</sup> Plasmazellen des Knochenmarks gezeigt, jedoch nicht für alle IgA<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen. Während alle IgA<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen aus dem Blut CCR10<sup>+</sup> oder CCR10<sup>schwach</sup> waren, koexprimierten  $55 \pm 15\%$  (31 - 69 %)  $\beta_7$ -Integrin (Abb. 26), jedoch nicht CCR9 (Abb. 28B, 30A). Weiterhin wurden CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin auch von IgA<sup>-</sup> Plasmablasten bzw. Plasmazellen exprimiert (Abb. 25B, 29). 7 Tage nach Tetanusimmunisierung exprimierten eindeutig parenteral induzierte rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten kein CCR10 (96 % der rTT.C<sup>+</sup> Plasmablasten waren CCR10<sup>-</sup>, 2 Probanden, Abb. 25C) oder  $\beta_7$ -Integrin (Abb. 24A). Damit einhergehend war die Frequenz der CCR10<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zum Zustand vor Immunisierung deutlich verringert ( $18 \pm 11\%$ , 9 - 33 %, 4 Probanden).



**Abb. 26. Gleichzeitige Expression von IgA,  $\beta_7$ -Integrin und CCR10 auf Plasmablasten und Plasmazellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks.**

Plasmablasten und Plasmazellen wurden zur sukzessiven durchflusszytometrischen Analyse der Expression von IgA, CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin unter PBMZ und Knochenmarkzellen eingegrenzt. Die Expression von CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin (jeweils schwarze Histogramme, grau - Kontrollfärbung) unter den IgA<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen wird exemplarisch für 5 Analysen aus dem Blut und 2 Analysen aus dem Knochenmark dargestellt.

Bei 4 von 49 auf die Frequenz peripherer Plasmablasten und Plasmazellen getesteten Blutspendern war diese stark erhöht (> 0,5 % der PBMZ). Bei 2 dieser 4 Fälle solcher Immunaktivierung wurde gleichzeitig die Expression von CD62L und  $\beta_7$ -Integrin, nicht jedoch die von IgA oder CCR10 analysiert, und die Plasmablasten und Plasmazellen beider Probanden zeigten einen außergewöhnlich hohen Anteil  $\beta_7$ -Integrin - exprimierender Zellen (Abb. 27). Dies weist darauf hin, dass die ohnehin seltene Immunaktivierung solchen Ausmaßes häufiger in mukosalen als in systemischen Geweben stattfindet und zur Produktion mukosaler,  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup> Plasmablasten, nicht aber „systemischer“,  $\beta_7$ -Integrin<sup>-</sup> Plasmablasten führt.



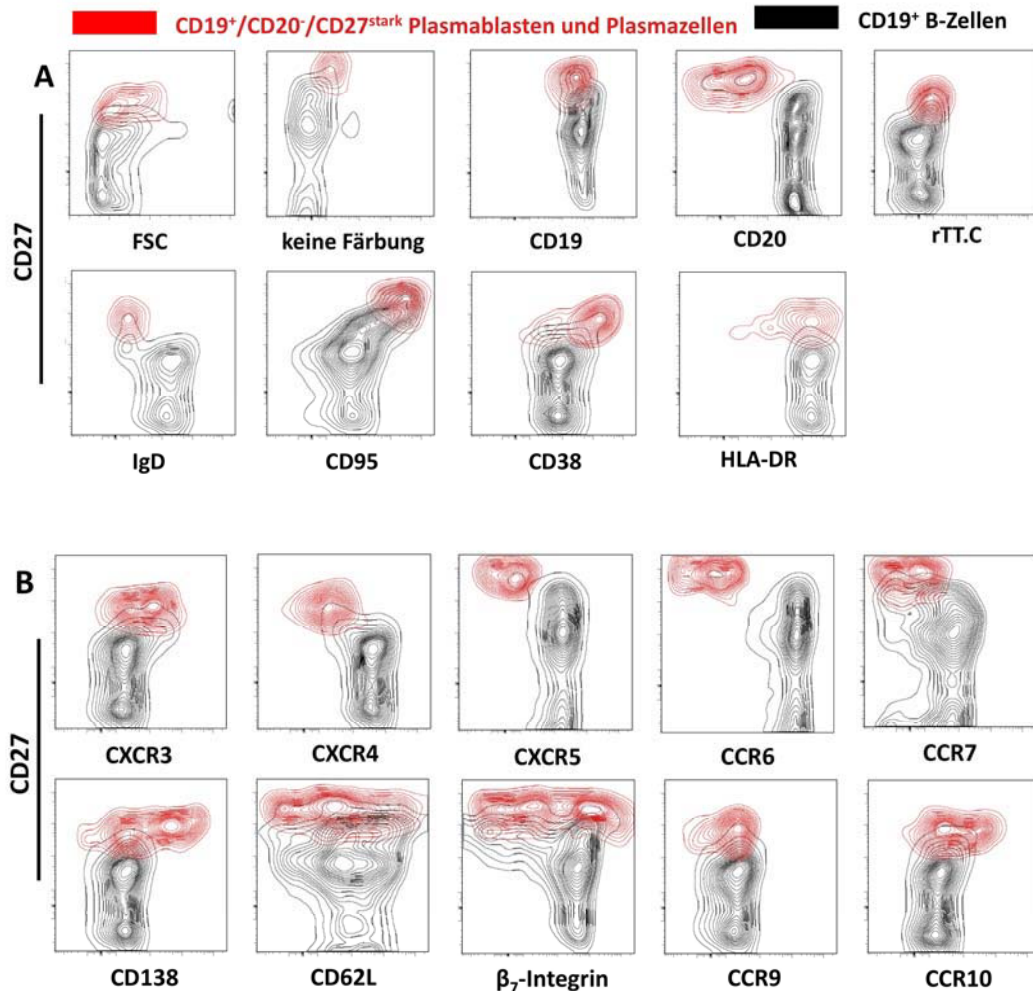
**Abb. 27: Die zufällige Detektion unbeabsichtigter Immunaktivierung auf Ebene zirkulierender Plasmablasten und Plasmazellen bei Blutspendern.**

Von 49 Probanden zeigten 4 eine erhöhte Frequenz der Plasmablasten/Plasmazellen unter den Lymphozyten von > 0,5 %. Bei 2 dieser 4 Probanden wurde gleichzeitig die Expression von CD62L und  $\beta_7$ -Integrin, nicht jedoch von IgA, IgG oder CCR10 untersucht. Beide solchermaßen analysierte Probanden wiesen eine sehr hohe Frequenz  $\beta_7$ -Integrin - exprimierender Plasmablasten/Plasmazellen auf, was auf ihre mukosale Herkunft hinweist [240].

#### 4.2.2 Der Phänotyp von Plasmablasten und Plasmazellen im immunologischen Gleichgewichtszustand

Abgesehen von der differentiellen Expression von IgG, IgA, CD62L, CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin unterschieden sich die Plasmablasten bzw. Plasmazellen im immunologischen Gleichgewicht phänotypisch qualitativ nicht von den Plasmablasten und Plasmazellen, die 7 Tage nach Tetanusimmunisierung im Blut charakterisiert worden waren (Abb. 17). Sie exprimierten den Phänotyp  $CD19^+/CD20^-/IgD^-/CD95^{stark/sehr\ stark}/CD38^{stark}/HLA-DR^{+/-}$ . Tetanusspezifische Plasmablasten waren zu diesem Zeitpunkt nicht detektierbar (Abb. 13, 15, 28A). CXCR3 wurde auch unter den Bedingungen des immunologischen Gleichgewichts von einer Subfraktion der Plasmablasten oder Plasmazellen gebildet. Die Expression von CXCR4 wurde durch ein schwaches Signal reflektiert. Signale für CXCR5, CCR6, CCR7 und CCR9 wurden weder auf der Oberfläche der hier analysierten Plasmablasten noch der der Plasmazellen detektiert. Damit grenzte sich der

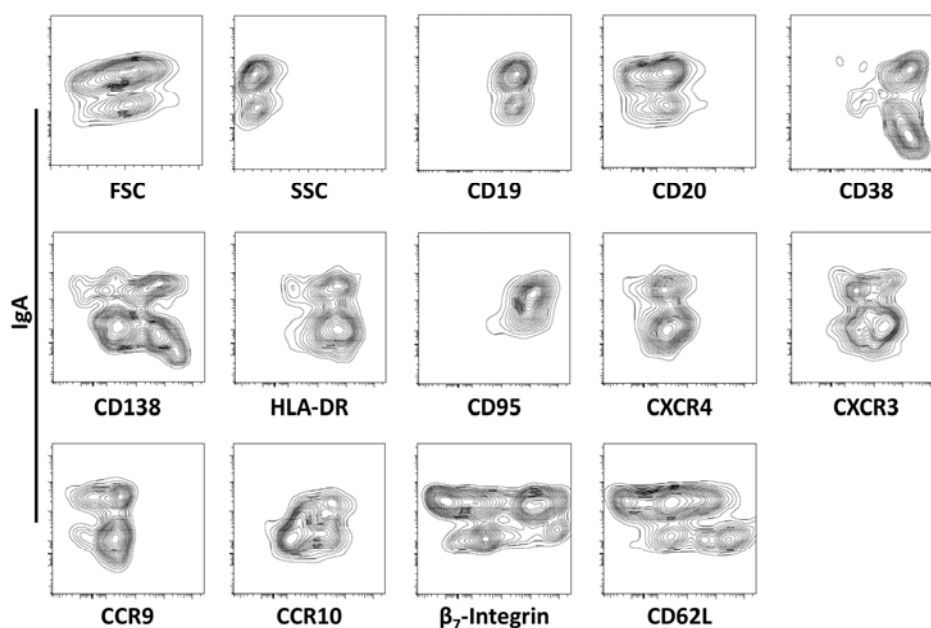
Migrationsphänotyp von Plasmablasten deutlich von demjenigen CD20-exprimierender naiver und Gedächtnis-B-Zellen ab, der als CXCR5<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> detektiert wurde. Weiterhin zeigten die Plasmablasten und Plasmazellen im Gleichgewichtszustand eine heterogene Expression der Adhäsionsmoleküle CD138, CD62L und  $\beta_7$ -Integrin (Abb. 28B).



**Abb. 28: Der Phänotyp zirkulierender Plasmablasten und Plasmazellen im immunologischen Gleichgewichtszustand.**

PBMZ von gesunden Blutspendern wurden isoliert und CD19<sup>+</sup> B-Zellen (schwarz) sowie Plasmablasten und Plasmazellen (rot) durchflusszytometrisch zur weiteren Analyse ausgewählt. Die analysierten Plasmablasten sowie Plasmazellen exprimierten mehrheitlich Immunglobulin A (Abb. 23 A,B,C, 29, 30E). In jedem FACS-Diagramm wurde die Expression von CD27 (Y-Achse) gegen die Expression des zu analysierenden Oberflächenmoleküls aufgetragen (X-Achse). Es wurden (A) die Streulichteigenschaften und Differenzierungsmarker sowie (B) Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren analysiert. Dabei handelt es sich um eine kumulative Zusammenstellung von Daten aus verschiedenen Experimenten, sodass die Streubreite des CD27-Signals aufgrund der angepassten Geräteeinstellung variiert. Jede Abbildung steht für mindestens 2 Analysen unterschiedlicher Probanden.

Der Vergleich simultan analysierter IgA<sup>+</sup> und IgA<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen belegte eine Assoziation der IgA-Expression mit erhöhter Expression von CD95, CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin sowie verringerter Expression von CXCR3, CD62L (Abb. 29). Hinsichtlich der Expression von HLA-DR, FSC, SSC, CD19, CD20, CCR9, CXCR4 und CD138 wiesen IgA<sup>+</sup> und IgA<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen keine signifikanten Unterschiede auf.



**Abb. 29: Der Phänotyp im Blut gesunder Probanden zirkulierender IgA<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen.**

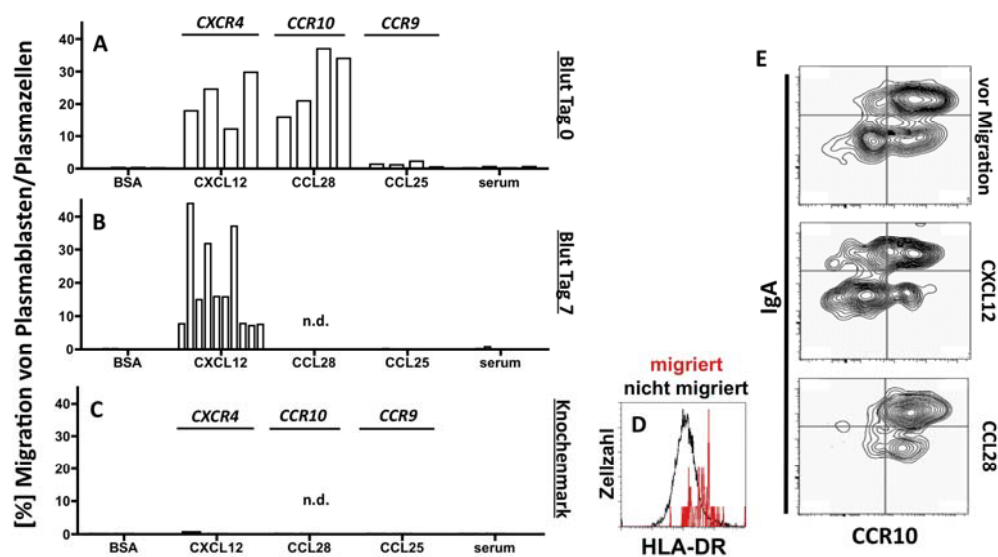
PBMZ von gesunden Probanden wurden isoliert und Plasmablasten/Plasmazellen durchflusszytometrisch zur weiteren Analyse eingegrenzt. In jedem FACS-Diagramm wurde die Expression von IgA (Y-Achse) gegen die Expression des zu analysierenden Oberflächenmoleküls aufgetragen (X-Achse). Jede Abbildung steht für mindestens 2 Analysen unterschiedlicher Probanden.

### 4.2.3 Plasmablasten des Gleichgewichtszustandes migrieren *in vitro* gegen das mukosale Chemokin CCL28

Übereinstimmend mit der Expression von CCR10 durch Plasmablasten im Gleichgewichtszustand konnte die spontane *in vitro* Migration entlang eines Konzentrationsgradienten des Liganden von CCR10, CCL28 (300 nM) nachgewiesen werden. Bei 4 Probanden wurden individuelle Frequenzen der gegen CCL28 migrierten Plasmablasten aus dem Blut bestimmt: 16 %, 21 %, 37 %, 34 %. 18 %, 25 %, 12 % und 30 % der Plasmablasten/Plasmazellen migrierten gegen 10 nM CXCL12, jedoch nicht gegen 300 nM CCL25 (< 2 %), den Chemokinliganden des

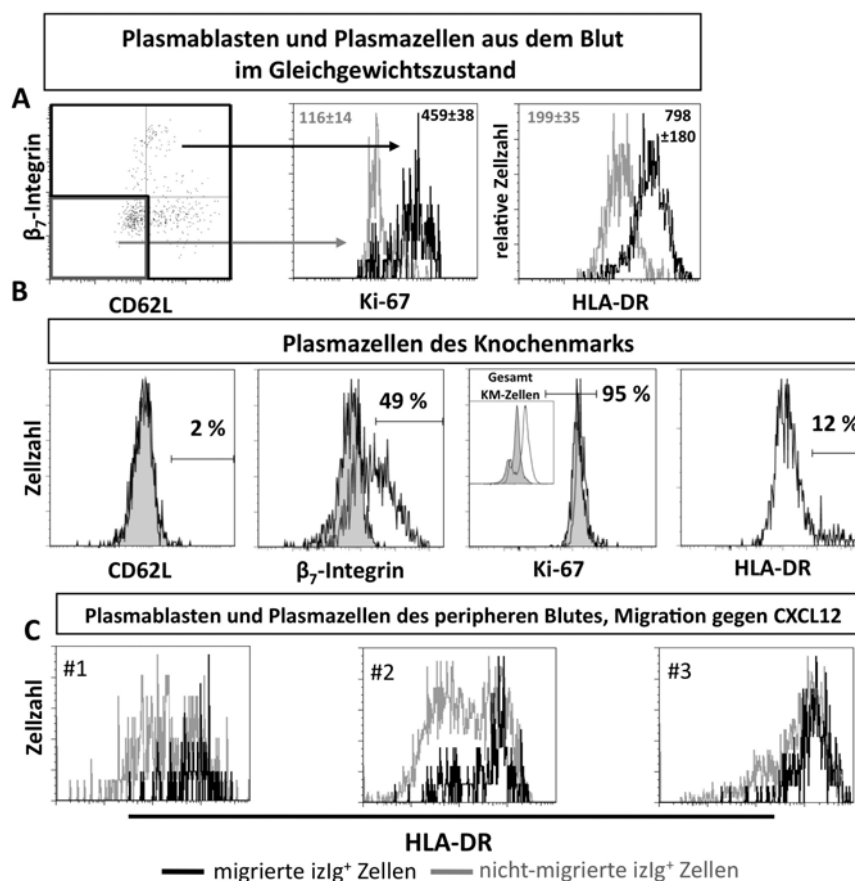


intestinalen Chemokinrezeptors CCR9 (Abb. 30A). Alle Plasmablasten, die im Gleichgewichtszustand gegen CCL28 migrierten, exprimierten den dazugehörigen Rezeptor CCR10. Die Mehrheit der gegen CXCL12 migrierten IgA<sup>+</sup> Plasmablasten exprimierte ebenfalls CCR10 (Abb. 30E). Von den vergleichsweise analysierten reifen Plasmazellen aus dem Knochenmark migrierten in allen Experimenten höchstens 0,6 % gegen CXCL12, CCL25 und CCL28 (2 Probanden), sodass > 99 % der Knochenmarksplasmazellen nicht migratorisch waren, obwohl die Zellen die Rezeptoren CXCR4 und CCR10, nicht jedoch CCR9 exprimierten (Abb. 30C, 33C). Knochenmarksplasmazellen wanderten *in vitro* ebenfalls nicht gegen Gradienten der inflammatorischen CXCR3-Liganden CXCL9 (100 nM), CXCL10 (23 nM) und CXCL11 (600 nM) (ohne Abb.). Die einzelnen Knochenmarksplasmazellen, die bei einem der zwei getesteten Probanden in der gegen CXCL12 migrierten Fraktion (0,55 %) nachgewiesen wurden, zeigten eine im Vergleich zu allen übrigen Knochenmarksplasmazellen hohe HLA-DR - Expression (Abb. 30D).



**Abb. 30: *In vitro* - Migration von Plasmablasten und Plasmazellen im Gleichgewichtszustand, 7 Tage nach einer Tetanusimmunisierung und von Plasmazellen aus dem Knochenmark.**

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes vor (A) oder 7 Tage nach Tetanusimmunisierung (B) oder des Knochenmarks (C) wurden in Transmigrationsexperimente eingesät. Nach 90 min Migrationszeit wurden die nicht migrierten Zellen aus den oberen und die migrierten Zellen aus den unteren Kompartimenten geerntet. Plasmablasten und Plasmazellen wurden, wie in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt, durchflusszytometrisch quantifiziert. In den Kontrollexperimenten, bei denen Blutserum oder BSA anstelle von Chemokinen eingesetzt wurde, migrierten stets  $\leq 3$  % der eingesäten Plasmablasten bzw. Plasmazellen. (D) In der Migrationsanalyse von Knochenmarksplasmazellen ergab eine der zwei durchgeführten Analysen eine Migrationsfrequenz gegen CXCL12 von 0,55 %. Die in diesem Experiment migrierten Plasmazellen (rot) zeigten eine höhere HLA-DR - Expression als die nicht migrierten Knochenmarksplasmazellen (schwarz). (E) Plasmablasten, die gegen CCL28 oder CXCL12 migrierten, wurden auf ihre Expression von IgA und CCR10 hin untersucht.



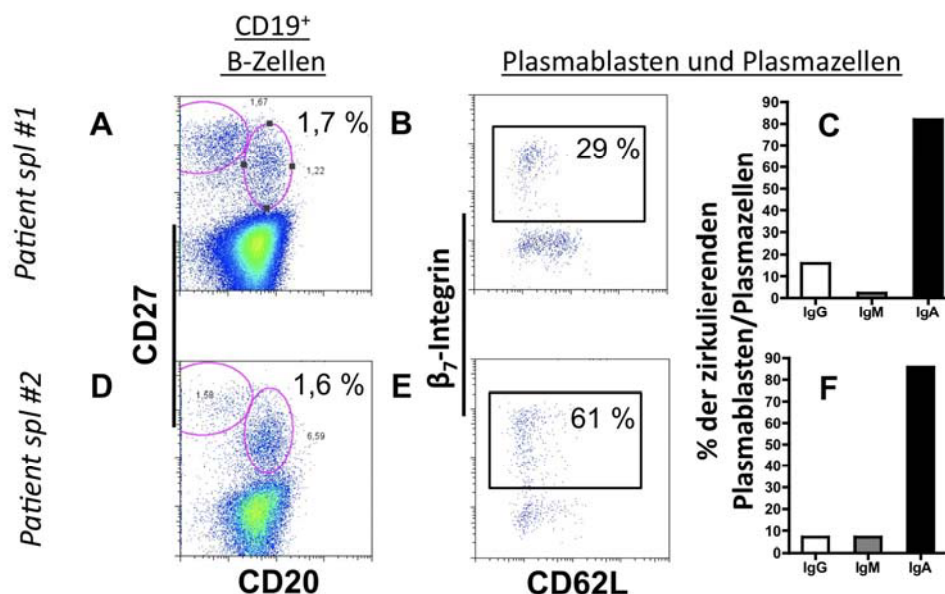
**Abb. 31: Nachweis von proliferierenden, HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten neben nicht proliferierenden HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen mit dem Phänotyp reifer Plasmazellen im peripheren Blut im Gleichgewichtszustand.**

(A) HLA-DR<sup>stark</sup>, Ki-67<sup>+</sup> Plasmablasten exprimierten simultan die Adhäsionsmoleküle  $\beta_7$ -Integrin oder CD62L, während HLA-DR<sup>schwach</sup>/Ki-67<sup>-</sup> Plasmazellen keine Expression dieser Adhäsionsmoleküle aufwiesen. Der Vergleich mit dem Phänotyp von Knochenmarksplasmazellen (CD62L<sup>-</sup>/ $\beta_7$ -Integrin<sup>+/+</sup>/Ki-67<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>schwach</sup>) (B) zeigt vor allem Übereinstimmung mit den im Blut nachgewiesenen HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen. Das eingefügte Diagramm im Ki-67-Diagramm zeigt alle mononukleären Zellen des Knochenmarks, die mit Anti-Ki-67 (schwarz) oder dem passenden Isotypkontrollantikörper (grau) gefärbt wurden, und bestätigt die Zuverlässigkeit der Ki-67 - Detektion bei Knochenmarkszellen. (C) 7 Tage nach Tetanusimmunisierung migrierten HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten gegen Konzentrationsgradienten von CXCL12, während HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen im gleichen Experiment nicht migrierten. Abgebildet ist das Ergebnis von 3 repräsentativen Analysen von insgesamt 7 Probanden.

#### 4.2.4 Die chronische Generierung zirkulierender Plasmablasten im Gleichgewichtszustand ist unabhängig von der Milz

Die bisher beschriebenen Experimente weisen sämtlich auf eine mukosale Herkunft und Differenzierung der Plasmablasten im Gleichgewichtszustand hin, jedoch konnte dies *in vivo* nicht weiter abgesichert werden. In einem komplementären Ansatz wurde daher Blut von Patienten mit Immunthrombozytopenie (AITP) untersucht, denen die

Milz entnommen worden war. Die Milz kommt neben den mukosalen Immungeweben prinzipiell ebenfalls als Quelle chronischer Plasmablastenproduktion infrage. Bei den Probanden handelte es sich um Patienten mit autoimmuner Thrombozytopenie, bei denen die Splenektomie als therapeutische Maßnahme durchgeführt wurde [241-245]. Bei diesen Probanden konnte ein signifikanter und im Zeitverlauf nach Splenektomie fortschreitender Verlust zirkulierender CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen, aber auch klassengewechselter CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup> Gedächtnis-B-Zellen, nicht aber zirkulierender CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen nachgewiesen werden [243]: Bei 3 der insgesamt 4 untersuchten splenektomierten Probanden waren Anzahl und Frequenz der CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Plasmablasten/Plasmazellen unter den CD19<sup>+</sup> B-Zellen normal (40/ml, 0,03 %; 782/ml, 1,6 %; 2.948/ml, 1,7 % und 2.136/ml, 3,3 %, ohne Abb.). Bei 2/4 splenektomierten Patienten (ein Mann, 38 Jahre alt, 10,3 % CD19<sup>+</sup> B-Zellen unter Lymphozyten und eine Frau, 90 Jahre alt, 2,5 % CD19<sup>+</sup> B-Zellen unter Lymphozyten) wurden analog zu den Abbildungen 23 und 24 der Isotyp sowie die Expression von  $\beta_7$ -Integrin und CD62L der zirkulierenden Plasmablasten und Plasmazellen analysiert (Abb. 32). Ähnlich wie bei gesunden Probanden konnten im Blut der splenektomierten Probanden vor allem IgA<sup>+</sup>/ $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen nachgewiesen werden. Die Frequenz intrazellulär IgA-exprimierender Zellen unter PBMZ betrug 0,36 % und 0,12 % (Patient #1 und #2), die IgG-exprimierender Zellen 0,07 % und 0,01 % und die IgM-exprimierender Zellen 0,01 % bei beiden Probanden. Die Expression von CCR10 wurde hier nicht untersucht.



**Abb. 32: Aufrechterhaltung chronischer IgA<sup>+</sup> Plasmablastenproduktion bei splenektomierten Patienten.**

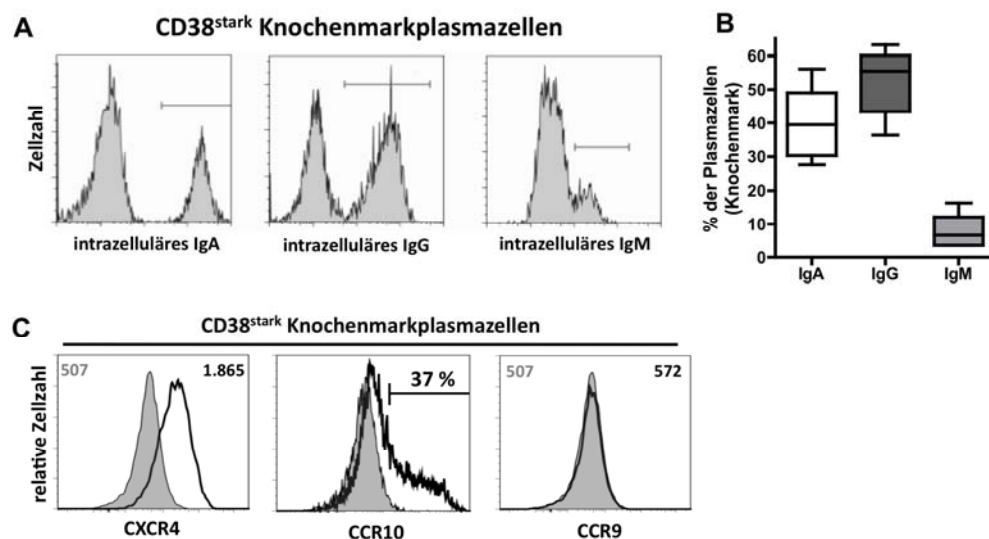
PBMZ von 2 splenektomierten Patienten wurden isoliert und CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup>/DAPI<sup>-</sup> B-Zellen (A,D), unter ihnen die CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen (B,C,E,F), durchflusszytometrisch zur weiteren Analyse ausgewählt. Ähnlich wie bei gesunden Probanden waren CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen in normaler Frequenz unter den B-Zellen nachweisbar (A,D) und exprimierten  $\beta_7$ -Integrin (B,E) und IgA, jedoch selten IgG oder IgM (C,F).

#### 4.2.5 Eigenschaften von Plasmazellen im humanen Knochenmark

Als Vergleichspopulation zu den im Blut zirkulierenden Plasmablasten und Plasmazellen wurden Plasmazellen des humanen Knochenmarks analysiert. Sie sind das Produkt systemischer Immunaktivierung [129] und können lange Zeit überleben [6]. Bis zu ihrem Tod sezernieren sie Antikörper und repräsentieren das humorale Immungedächtnis [120, 128].

Plasmazellen des Knochenmarks zeigten einen reifen Phänotyp: sie exprimierten CD38 etwa 100-mal so stark wie der Durchschnitt der übrigen mononukleären Zellen, sowie als einzige unter den mononukleären Zellen des Knochenmarks CD138 und intrazelluläres Immunglobulin (Abb. 8A-D). Wenn überhaupt, exprimierten sehr wenige Knochenmarksplasmazellen den Proliferationsmarker Ki-67 ( $5 \pm 3$  %) oder waren HLA-DR<sup>stark</sup> ( $12 \pm 6$  %). CD62L konnte auf der Oberfläche von Knochenmarksplasmazellen nicht nachgewiesen werden ( $2 \pm 5$  %) und etwa die Hälfte ( $49 \pm 9$  %) exprimierte  $\beta_7$ -Integrin (Abb. 31C,  $\geq 3$  Probanden). Außerdem konnte bei durchschnittlich  $39,5 \pm 9,8$  % (Bereich 27,6 - 56,1 %) der Plasmazellen

des Knochenmarks die Expression von IgA nachgewiesen werden, IgG-Expression bei  $55,1 \pm 9,1 \%$  (36,4 - 63,2 %) und IgM-Expression bei  $6,7 \pm 4,7 \%$  (3,6 - 16,3 %).  $37 \pm 10 \%$  (28 - 52 %) aller Plasmazellen im Knochenmark, einschließlich der IgA<sup>+</sup> Plasmazellen exprimierten CCR10, jedoch nicht CCR9 (Abb. 33A-C). Somit zeigte ein bedeutender Teil, etwa 40 %, der Knochenmarksplasmazellen einen Phänotyp, der auf ihre mukosale Herkunft hinweist, etwa 60 % stammten dementsprechend nicht aus mukosalen, sondern systemischen Immunreaktionen. CXCR4 wurde auf allen Knochenmarksplasmazellen exprimiert (Abb. 33C). Dies ging jedoch nicht mit einer effektiven *in vitro* - Migration der Plasmazellen einher (Abb. 30C).



**Abb. 33: Knochenmarksplasmazellen exprimieren IgA und IgG, CXCR4 und CCR10.**

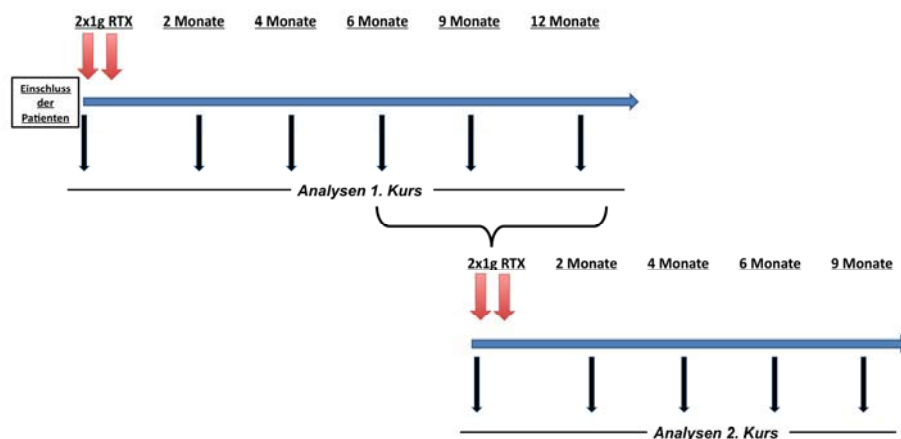
(A) Durchflusszytometrische Detektion von intrazellulär (iz)IgA<sup>+</sup> Plasmazellen, izIgG<sup>+</sup> Plasmazellen und izIgM<sup>+</sup> Plasmazellen unter zuvor elektronisch eingegrenzten CD38<sup>stark</sup> Plasmazellen des Knochenmarks. (B) Am häufigsten wurde IgG von Knochenmarksplasmazellen exprimiert, 40 % exprimierten IgA. (C) Die Oberflächenexpression von CXCR4, CCR10 und CCR9 (schwarz) auf Knochenmarksplasmazellen wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung angepasster Isotyp/FMO - Kontrollen (grau) analysiert. Die angegebenen Zahlen bezeichnen geometrisch gemittelte Fluoreszenzintensitäten (MFI).

#### **4.3 Persistierende Produktion mukosaler Plasmablasten unter B-Zell-depletierender Therapie**

Bisher wurde gezeigt, dass bei gesunden Menschen chronisch IgA-sezernierende Plasmablasten produziert werden, die einen mukosalen Zellmigrationsphänotyp aufweisen und deren Produktion nicht oder höchstens unwesentlich von der Milz abhängt. Über deren Differenzierung und die ihnen zugrundeliegenden Immunreaktionen konnte bisher keine sichere Aussage gemacht werden. Dieses sollte anhand von B-Zell- und Plasmazellanalysen bei Patienten unter therapeutischer B-Zell-Depletion untersucht werden. Bei diesen Patienten wurde der Transfer zirkulierender naiver und antigenerfahrener CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen für bis zu 21 Monate durch die B-Zell-Depletionstherapie unterbrochen. Dabei wurde für diesen Zeitraum insbesondere die Bereitstellung „konventioneller“ naiver B-Zellen (B2 Zellen) aus dem Knochenmark unterbunden.

Die B-Zell-depletierende Therapie mit Rituximab wurde hier bei Patienten mit RA angewandt. Klinische Studien belegten bereits vorher die Wirksamkeit von Rituximab bei der Behandlung der RA, wobei etwa ein Drittel der Patienten auf die Therapie nicht mit signifikanter klinischer Besserung (*Response*) reagierten [94-97]. Daher sollte in diesem Kontext weiterhin untersucht werden, ob spezifische Merkmale oder Funktionen bzw. die Anzahl von B-Zellen oder Plasmablasten und Plasmazellen als Responseindikator dienen könnten, d. h. mit der Erkrankungsaktivität korrelierten oder eine Vorhersage über den Therapieerfolg ermöglichen würden.

Bei dieser Studie wurde eine Gruppe von RA-Patienten vor und 2, 4, 6, 9 und 12 Monate (Mediane der erfolgten Analysezeitpunkte 56 Tage, 112 Tage, 170 Tage, 252 Tage, 330 Tage) nach B-Zell-depletierender Rituximab (RTX)-Behandlung (zweimal 1 g in 14-tägigem Abstand, durch Infusion) hinsichtlich der Anzahl und Charakteristika der B-Zellen des peripheren Blutes sowie der Erkrankungsaktivität charakterisiert (Abb. 34).

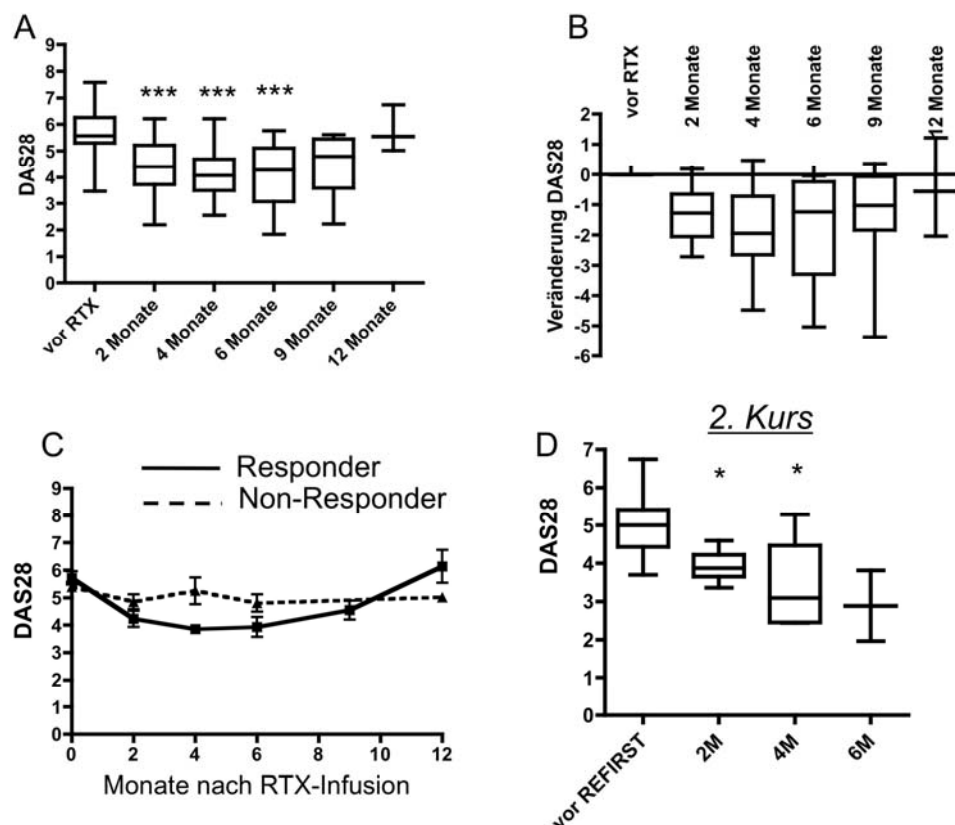


**Abb. 34: Therapie- und Analysezeitplan bei Rituximab-behandelten RA-Patienten.**

6-12 Monate nach der ersten Behandlung mit Rituximab wurden weiterhin Proben von 11 Patienten infolge eines zweiten Behandlungskurses analysiert.

#### 4.3.1 Klinisches Ansprechen auf die B-Zell-Depletion

Ähnlich wie in früheren Studien beschrieben [94-97], wurde durch die Gabe von Rituximab klinische Besserung erzielt. Bei den hier untersuchten Patienten sank die mittlere Erkrankungsaktivität (DAS28) [207, 208] vom durchschnittlichen Indexwert 5,7 vor Beginn der Therapie auf 4,3 nach 2 Monaten, jeweils 4,1 nach 4 und 6 Monaten, stieg nach 9 Monaten auf 4,6 an und lag nach 1 Jahr bei 5,8 (Abb. 35A). Die maximale Reduktion der durchschnittlichen Krankheitsaktivität um 1,8 Indexpunkte wurde 4 Monate nach RTX-Infusion beobachtet (Abb. 35B). Basierend auf den EULAR-Kriterien wurden von insgesamt 28 Patienten 18 als auf die Therapie ansprechend eingestuft (64 %), 5 als nicht ansprechend (18 %) (Abb. 35C) und von 5 Patienten (18 %) lagen bisher keine DAS28-Werte für den Therapieverlauf vor. Die erneute Behandlung mit RTX bewirkte erneut eine klinische Besserung bei 7 von insgesamt 11 Patienten, zwei wurden gemäß EULAR-Kriterien als *Non-Responder* klassifiziert und bei zwei Patienten konnte noch keine Aussage zum klinischen Ansprechen getroffen werden. Der DAS28-Index sank hier von 5,0 vor dem zweiten Behandlungskurs auf 3,9 nach 2 Monaten und 3,3 nach 4 Monaten (bzw. 2,9 nach 6 Monaten, bislang 2 Messwerte verfügbar, Abb. 35D).



**Abb. 35: Verlauf des RA-Krankheitsaktivitätsindex DAS28 nach Einleitung der B-Zell-Depletion.**

(A) Entwicklung der absoluten DAS28-Werte, (B) Veränderung der DAS28-Werte im Verhältnis zum Zustand vor Therapie (DAS28 vor RTX = 0), (C) Vergleich der DAS28-Entwicklung bei gutem vs. schlechtem klinischem Ansprechen und (D) DAS28-Entwicklung während eines zweiten Rituximab-Behandlungskurses. In (A) und (D) wurde die signifikante Veränderung im Vergleich zum DAS28-Index vor Einleitung des ersten bzw. zweiten Behandlungskurses mit \*,  $p < 0,05$ , \*\*\*,  $p < 0,001$  (Mann-Whitney-Test) gekennzeichnet (M, Monate).

#### 4.3.2 Nachweis zirkulierender Plasmablasten und Plasmazellen nach therapeutischer Depletion CD20-exprimierender B-Zellen

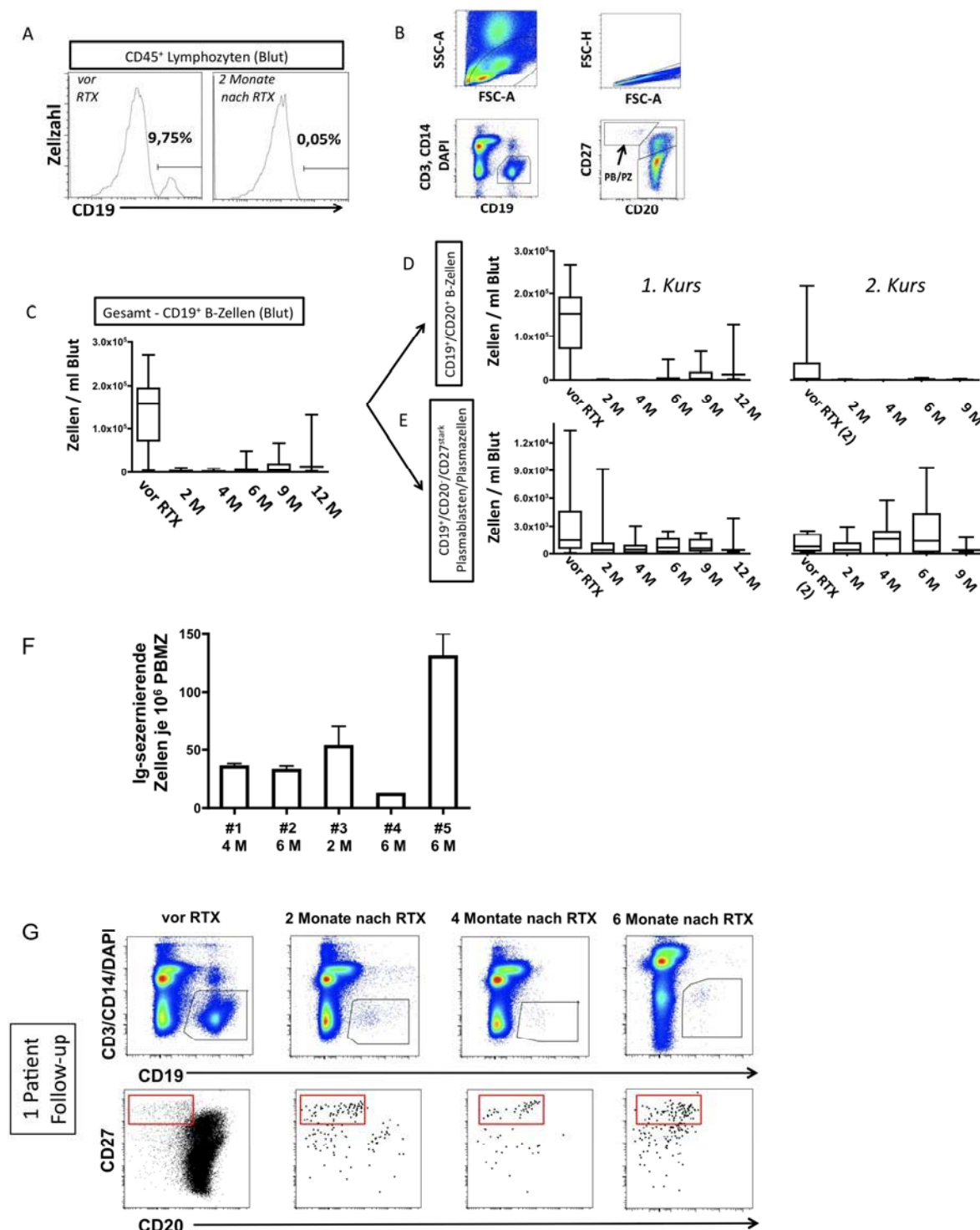
Für die Analyse von B-Zellen, Plasmablasten und Plasmazellen wurden B-Zellen unabhängig von der Expression des Rituximabzielmoleküls CD20 anhand der Expression von CD19 durchflusszytometrisch identifiziert (Abb. 36B). Die Abbildungen 36A und 36C belegen eine drastische Reduktion der CD19<sup>+</sup> B-Zellen 2 Monate nach der initialen Behandlung. Vor Therapiebeginn wurden durchschnittlich 158 CD19<sup>+</sup> B-Zellen/ $\mu$ l Blut gezählt (Median, Bereich 3,7 - 270/ $\mu$ l), 2 Monate danach 1,1/ $\mu$ l (0 - 10/ $\mu$ l), nach 4 Monaten 1,0/ $\mu$ l (0,1 - 7,8/ $\mu$ l), nach 6 Monaten 2,6/ $\mu$ l (0,3 - 49/ $\mu$ l), nach 9 Monaten 4,5/ $\mu$ l (0,1 - 67,5/ $\mu$ l), und nach 12 Monaten 13/ $\mu$ l (2,4 - 132/ $\mu$ l) (Abb. 36C). Diese Zahlen verdeutlichen, dass es sowohl Patienten mit



lang anhaltender Depletionsphase gab (mindestens 1 Jahr) als auch solche, die nach 1 Jahr bereits wieder normale B-Zell-Zahlen erreicht hatten. Nicht alle Patienten wurden bis zu diesem Zeitpunkt verfolgt, da häufig bereits vor Ablauf der Studie eine zweite Rituximab-Behandlung durchgeführt wurde (Abb. 35D, 36D,E) oder seltener Patienten die weitere Teilnahme an der Studie verweigerten. 12 Monate nach Beginn der Therapie waren 3 von 5 der zu diesem Zeitpunkt untersuchten Patienten in der Depletionsphase, während 2 Patienten B-Zell-Zahlen im Referenzbereich Gesunder aufwiesen. Gegenüber denjenigen Patienten, die auf die Therapie ansprachen (18 Patienten) wiesen diejenigen, die nicht ansprachen (5 Patienten) vor Beginn der Therapie doppelt so hohe B-Zell-Zahlen auf (Median 119/ $\mu$ l, Bereich 3,7 - 270/ $\mu$ l versus 242/ $\mu$ l, Bereich 159 - 435/ $\mu$ l,  $p = 0,0189$ , Mann-Whitney-Test) (Abb. 37A).

Die Detailanalyse der wenigen im Blut verbliebenen CD19<sup>+</sup> B-Zellen (Abb. 36D,E,G) ergab, dass bei allen Patienten nach 2 und 4 Monaten infolge der RTX-Infusion CD19 und CD20 koexprimierende B-Zellen depletiert waren. Vor der Therapie wurden 154 CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen je  $\mu$ l (Median, Bereich 0,1 - 268/ $\mu$ l) detektiert, 0,3/ $\mu$ l (0 - 1,8/ $\mu$ l,  $p < 0,0001$ ) nach 2 Monaten, 0,5/ $\mu$ l (0 - 0,7/ $\mu$ l,  $p < 0,0001$ ) nach 4 Monaten, 1,7/ $\mu$ l (0 - 47/ $\mu$ l,  $p < 0,0001$ ) nach 6 Monaten, 3,2/ $\mu$ l (0 - 66/ $\mu$ l,  $p < 0,0001$ ) nach 9 Monaten und 12/ $\mu$ l (2,2 - 128/ $\mu$ l,  $p = 0,072$ ) nach 12 Monaten ( $p$ -Werte bezeichnen Signifikanzniveaus im Vergleich zum Zustand vor der Therapie, Abb. 36D).

Eine Repopulation des peripheren Blutes mit CD20<sup>+</sup> naiven und Gedächtnis-B-Zellen ( $> 6/\mu$ l) wurde erstmalig 6 Monate bei 3 der untersuchten 20 Patienten (15 %) festgestellt. 3/3 dieser Patienten wurden gemäß EULAR-Kriterien als *Responder* klassifiziert.



**Abb. 36: Nachweis zirkulierender CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen im zeitlichen Verlauf nach erfolgreicher CD20<sup>+</sup> B-Zell-Depletion.**

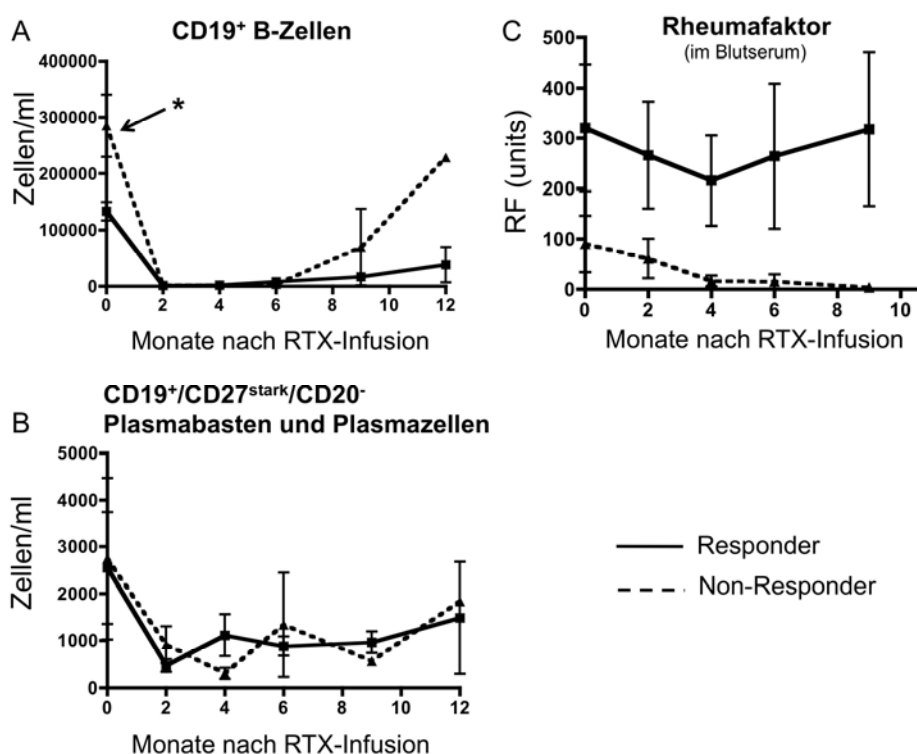
(A) Nachweis von CD19<sup>+</sup> B-Zellen unter CD45<sup>++</sup> Leukozyten vor und nach B-Zell-depletierender Therapie mit Rituximab. (B) Strategie zur durchflusszytometrischen Unterscheidung CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup> naiver B-Zellen, CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen sowie CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen. B-Zellen wurden durchflusszytometrisch als CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/DAPI<sup>-</sup> Lymphozyten detektiert. (C) Kinetik der CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten nach B-Zell-Depletion mit therapeutischem Anti-CD20-Antikörper (M, Monate). (D + E) Unterschiedlich starke Reduktion der CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen und der CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen während der B-Zell-Depletion. CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen

verschwinden vollständig aus dem peripheren Blut, während durchschnittlich 25 % der ursprünglichen Anzahl der CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen während der B-Zell-Depletion gemessen wurden. (F) Exemplarischer Nachweis antikörpersezernierender Zellen unter PBMZ in 5 Blutproben B-Zell-depletierter RA-Patienten durch das EliSpot-Verfahren. (G) Nachweis von CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen (unten) bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen im zeitlichen Verlauf nach Infusion des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab bei einem einzelnen Patienten. Oben ist die Eingrenzung von CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup>/DAPI<sup>-</sup> B-Zellen dargestellt.

Die Depletionsrate der CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> B-Zellen betrug 2 Monate nach der RTX-Infusion durchschnittlich 99,98 %, während die CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen simultan um durchschnittlich 73,56 % reduziert vorlagen (Abb. 36E). Solche CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen konnten in nahezu allen untersuchten Proben unter B-Zell-Depletion nachgewiesen werden. Vor der B-Zell-Depletion betrug ihre Anzahl im peripheren Blut 1,48/μl (Median, Bereich 0,06 - 13,28/μl), 0,39/μl (0 - 9,16/μl, p = 0,0078) nach 2 Monaten, 0,44/μl (0,03 - 3,03/μl, p = 0,0033) nach 4 Monaten, 0,65/μl (0 - 2,45/μl, p = 0,0538) nach 6 Monaten, 0,59/μl (0,03 - 2,29/μl, p = 0,0597) nach 9 Monaten und 0,39/μl (0,19 - 3,87/μl, p = 0,3971) nach 12 Monaten (Abb. 36E). Durch erneute Infusion von Rituximab 6 - 12 Monate nach dem ersten Kurs wurde bei 11 Patienten die B-Zell-Depletionsphase auf insgesamt maximal 21 Monate verlängert. Bei diesen Patienten betrug die Anzahl der CD19 und CD20 koexprimierenden B-Zellen 2 Monate nach Beginn des zweiten Kurses 0,07/μl (0,00 - 1,94/μl, p = 0,0188), 0/μl (0,00 - 0,46/μl, p = 0,0037) nach 4 Monaten, 0,53/μl (0,01 - 5,16/μl, p = 0,1996) nach 6 Monaten und 0,27/μl (0,06 - 3,21/μl, p = 0,3727) nach 9 Monaten. Gleichzeitig wurde eine stabile Anzahl von CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen beobachtet: 0,39/μl (0,0 - 2,90/μl, p = 0,1431) nach 2 Monaten, 1,59/μl (0,00 - 5,68/μl, p = 1,000) nach 4 Monaten, 1,37/μl (0,02 - 9,18/μl, p = 0,6607) nach 6 Monaten und 0,38/μl (0,21 - 1,75/μl, p = 0,4685) nach 9 Monaten (Abb. 36D,E; p-Werte bezeichnen Signifikanzniveaus im Vergleich zum Ausgangszustand vor dem 2. Behandlungskurs).

Zwischen dem klinischen Ansprechen auf die Therapie und der Anzahl persistierender Plasmablasten und Plasmazellen wurde keine signifikante Beziehung festgestellt. Beispielsweise wiesen 2 Monate nach RTX-Infusion Patienten mit gutem oder moderatem Ansprechen durchschnittlich 468 (Bereich 0-1.563/μl) Plasmablasten und Plasmazellen je μl Blut auf (13 Proben), Patienten mit

schlechtem Ansprechen 905/ $\mu$ l (29 - 1.880/ $\mu$ l, 4 Proben,  $p = 0,7555$ ) (Abb. 37B). Eine Korrelation zwischen der  $CD19^+/CD27^{stark}/CD20^-$  Plasmablasten/Plasmazellen-Anzahl und dem DAS28-Index bestand lediglich 6 Monate nach RTX-Infusion, nicht aber vor Einleitung der Therapie oder zu anderen Analysezeitpunkten (Abb. 38). Drastische Unterschiede zwischen *Respondern* und *Non-Respondern* bestanden hingegen hinsichtlich der B-Zell-Zahl vor Therapiebeginn und der Rheumafaktoraktivität im Blutserum. Vor Einleitung der Therapie wiesen *Non-Responder* im Vergleich zu *Respondern* mehr als doppelt so hohe absolute B-Zell-Zahlen auf (durchschnittlich 284/ $\mu$ l versus 133/ $\mu$ l,  $p < 0,01$ , Mann-Whitney-Test) und zeigten eine frühere Repopulation des peripheren Blutes mit  $CD20$ -exprimierenden B-Zellen (Abb. 37A). Außerdem wiesen *Non-Responder* vor und während der B-Zell-Depletion eine durchschnittlich schwache oder keine Rheumafaktor (RF)-Aktivität (Abb. 37C) auf.

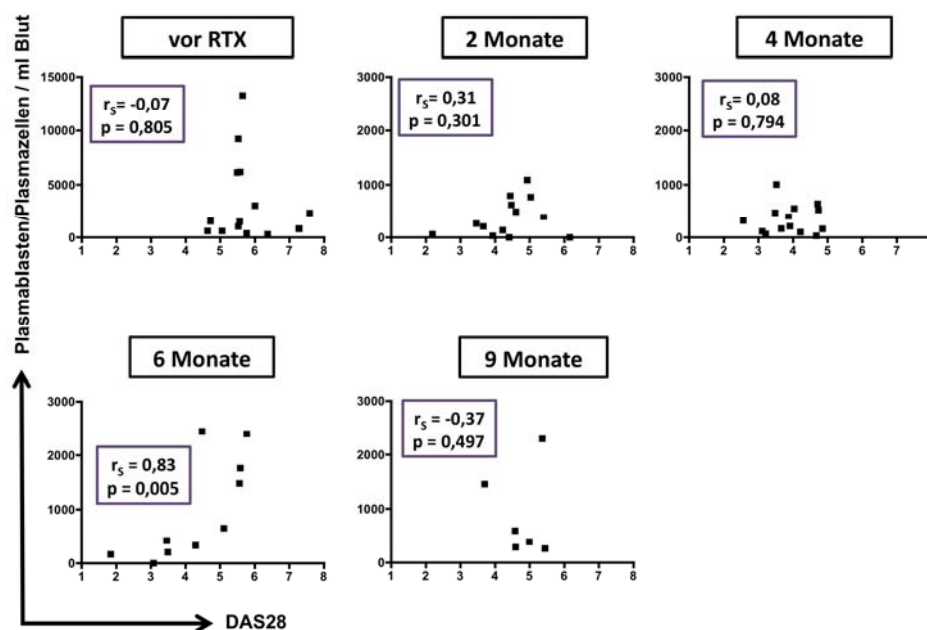


**Abb. 37: Differentielle Analyse der B-Zell-Zahl, Rheumafaktoraktivität und Anzahl der Plasmablasten und Plasmazellen bei Respondern vs. Non-Respondern.**

(A) Differentielle Kinetik  $CD19$ -exprimierender B-Zellen nach RTX-Infusion bei *Respondern* und *Non-Respondern*, (B) Kinetik der Plasmablasten/Plasmazellen bei *Respondern* und *Non-Respondern* nach RTX-Infusion und (C) Nachweis des RF im Blutserum von *Respondern* und *Non-Respondern* (mit \*,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test).

Vier verschiedene Techniken wurden eingesetzt um abzusichern, dass die  $CD19^+/CD20^-/CD27^{\text{stark}}$  Lymphozyten, die unter B-Zell-Depletion detektiert wurden, tatsächlich funktionelle Plasmablasten bzw. Plasmazellen waren:

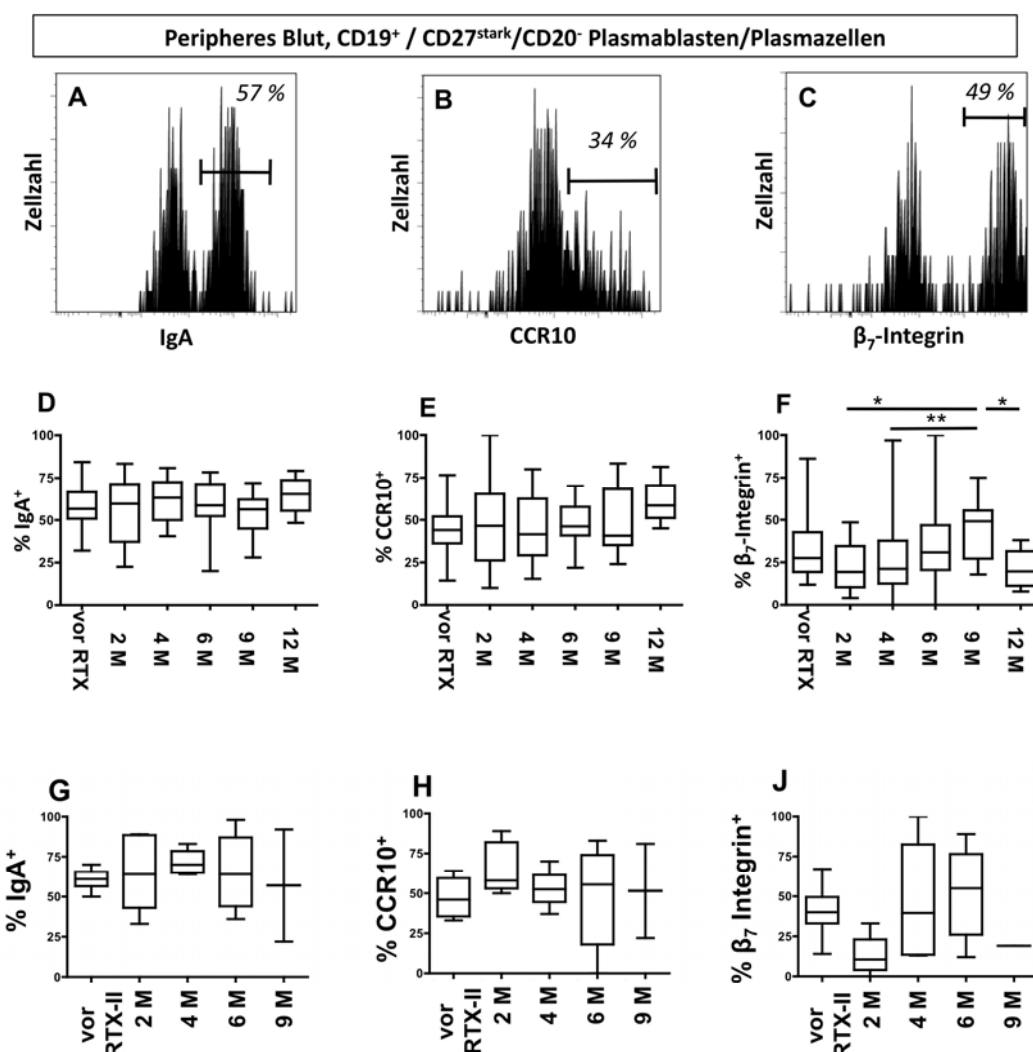
- I) Bei durchflusszytometrischen Analysen wurde stets eine hohe Anzahl an Messpunkten akquiriert, und es wurde ein Messkanal zum elektronischen Ausschluss möglicherweise die Analyse verfälschender  $CD3^+$  T-Zellen,  $CD14^+$  Monozyten und toter Zellen (Abb. 36B) verwendet.
- II) Exemplarisch wurden EliSpot-Experimente anstelle durchflusszytometrischer Analysen durchgeführt, bei denen durchschnittlich 53 antikörpersezernierende Zellen je 1 Million PBMZ unter B-Zell-Depletion (zwischen 12 und 130 Zellen, 5 Proben) gezählt wurden (Abb. 36F).
- III) In Zellkulturüberständen von PBMZ B-Zell-depletierter Patienten wurde die spontane Produktion von Antikörpern nachgewiesen (Abb. 41A).
- IV) Bei PBMZ, die von *in vivo* B-Zell-depletierten Patienten gewonnen wurden, wurde die starke Expression intrazellulären Immunglobulins nachgewiesen (ohne Abb.).



**Abb. 38: Korrelationsanalyse zwischen der Anzahl von Plasmablasten und Plasmazellen mit der Krankheitsaktivität (DAS28) vor und unter der *in vivo* B-Zell-Depletion bei RA-Patienten.**

Die Anzahl der Plasmablasten und Plasmazellen des peripheren Blutes vor und 2, 4, 6 und 9 Monate nach B-Zell-depletierender Therapie (1. Kurs) wurde zusammen mit den korrespondierenden DAS28-Werten (soweit erhoben und zugänglich) dargestellt. Die zum Teil unterschiedliche Probandenanzahl kam durch das Fehlen einiger DAS28-Werte sowie den Ausschluss einiger Patienten aus der Studie zustande (3.1). Die  $r_s$ - und p-Werte illustrieren die Ergebnisse linearer Regressionsanalysen (Spearman's Test).

Zusammengefasst wurden hier RTX-resistente, antikörpersezernierende Plasmablasten bzw. Plasmazellen bei simultaner, umfassender Depletion CD20-exprimierender B-Zellen nachgewiesen. Eine erneute B-Zell-Depletion führte nicht zu einer weiteren Reduktion dieser Zellen im peripheren Blut und eine generelle Korrelation zwischen dem Auftreten von Plasmablasten und Plasmazellen mit dem Therapieansprechen oder der Krankheitsaktivität wurde nicht belegt. Basierend darauf wurden Analysen zur Herkunft und Funktionalität der RTX-resistenten Zellen durchgeführt.



**Abb. 39: Analyse der Expression von IgA, CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin auf zirkulierenden Plasmablasten und Plasmazellen bei RA-Patienten vor und unter B-Zell-Depletion.**

CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Plasmablasten und Plasmazellen wurden durchflusszytometrisch identifiziert und auf ihre Expression von IgA, CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin hin untersucht. (A-C) Repräsentative Bestimmung der Frequenz IgA<sup>+</sup>, CCR10<sup>stark</sup> oder  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen anhand von FACS-Histogrammen. (D-F) Zeitlicher Verlauf der Expression von IgA, CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin nach B-Zell-Depletion mit Rituximab und während eines zweiten Behandlungskurses (G-J) (M, Monate, \*, p < 0,05, \*\*, p < 0,01, Mann-Whitney-Test).

#### 4.3.3 Produktion von proliferierenden und migratorischen Plasmablasten mit mukosalem Phänotyp während therapeutischer B-Zell-Depletion

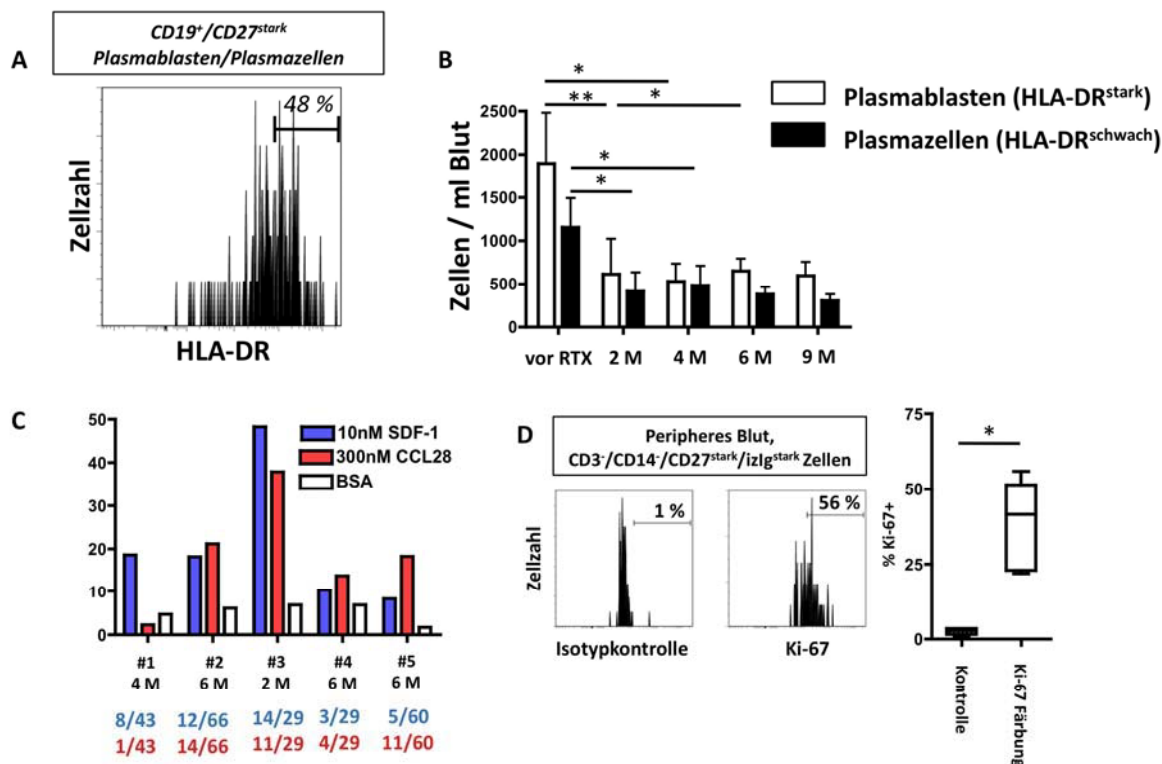
Durchflusszytometrische Gegenfärbungen zur Detektion von IgA, dem mukosalen Chemokinrezeptor CCR10 und dem mukosalen Adhäsionsmolekül  $\beta_7$ -Integrin auf CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD27<sup>stark</sup> Plasmablasten und Plasmazellen vor und während der B-Zell-Depletion (1. und 2. Kurs) belegen einen Anteil von durchschnittlich 60 % für die Expression von IgA, 41 % für die starke Expression von CCR10 und 28 % für  $\beta_7$ -Integrin (Abb. 39, Tabelle 8). Insgesamt wurde die Expression dieser Moleküle mit Ausnahme einzelner Messungen bei allen Probanden zu allen Zeitpunkten der B-Zell-Depletion nachgewiesen (Abb. 39D-J). Darüber hinaus wurde die Expression von CCR10 und CXCR4 funktionell mit Hilfe von *in vitro* Transmigrationsexperimenten analysiert. Unter B-Zell-Depletion wurden migratorische (und simultan antikörpersezernierende) Plasmablasten nachgewiesen, die entlang von Konzentrationsgradienten des in mukosalen Geweben exprimierten CCR10 Liganden CCL28 [187] (300 nM) in mittlerer Frequenz von 19 % (zwischen 2 % und 38 %) und gegen 10 nM CXL12 (durchschnittliche Migration 21 %, 8 - 48 %, jeweils 5 Proben) migrierten (Abb. 40C). In Gegenwart von Rinderserumalbumin (0,5 % BSA) anstelle von Chemokinen migrierten durchschnittlich 5 % (2 - 7 %) der antikörpersezernierenden Zellen.

**Tabelle 8: Mediane, Minimum- und Maximumwerte der anteiligen Expression von HLA-DR<sup>stark</sup>, IgA, CCR10 und  $\beta_7$ -Integrin durch zirkulierende Plasmablasten und Plasmazellen bei RA-Patienten vor und unter B-Zell-Depletion durch Rituximab (RTX) während des ersten und zweiten Behandlungskurses.**

<u>1. Kurs</u>	vor RTX	2 Monate	4 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate
HLA-DR <sup>stark</sup> (%)	61 (41-81)	51 (17-82)	54 (40-100)	60 (35-97)	64 (44-82)	57 (40-66)
IgA <sup>+</sup> (%)	57 (32-84)	60 (23-83)	63 (41-81)	59 (20-78)	56 (28-72)	65 (48-79)
$\beta_7$ -Integrin <sup>+</sup> (%)	28 (12-86)	19 (4-49)	21 (0-97)	31 (0-100)	49 (18-75)	20 (8-38)
CCR10 <sup>+</sup> (%)	44 (14-77)	47 (10-100)	41 (15-80)	46 (22-70)	41 (24-83)	59 (45-81)
<u>2. Kurs</u>	vor RTX	2 Monate	4 Monate	6 Monate	9 Monate	
HLA-DR <sup>stark</sup> (%)	65 (40-80)	71 (16-100)	58 (33-60)	74 (26-81)	32 (13-72)	
IgA <sup>+</sup> (%)	61 (50-70)	64 (33-89)	70 (64-83)	64 (36-98)	57 (22-92)	
$\beta_7$ -Integrin <sup>+</sup> (%)	40 (14-67)	11 (0-33)	40 (13-100)	55 (12-89)	k. A.	
CCR10 <sup>+</sup> (%)	46 (33-64)	58 (50-89)	53 (37-70)	56 (0-83)	52 (22-81)	

Neben der Befähigung zur *in vitro* Migration sind eine starke HLA-DR - Expression und Proliferationsaktivität (Ki-67 - Expression) charakteristisch für frisch generierte Plasmablasten im Blut (4.1.4). Bei Patienten unter B-Zell-Depletion exprimierten zwischen 22 % und 56 % (Durchschnitt 41,7 %) der CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/izIg<sup>+</sup> Zellen den Proliferationsmarker Ki-67 (Kontrollfärbung 2,8 %, 7 Probanden, Abb. 40D) und durchschnittlich 51 - 64 % exprimierten HLA-DR<sup>stark</sup> (Tabelle 8, Abb. 40A,B). Dabei war die Relation der Anzahl von Plasmablasten zu Plasmazellen annähernd stabil und im Verlauf der signifikanten Reduktion beider Populationen nach B-Zell-Depletion (Abb. 40B) konnte keine signifikante Veränderung in ihrem Zahlenverhältnis untereinander festgestellt werden (alle p-Werte zwischen 0,08 und 1,00; Mann-Whitney-Test, Tabelle 8).





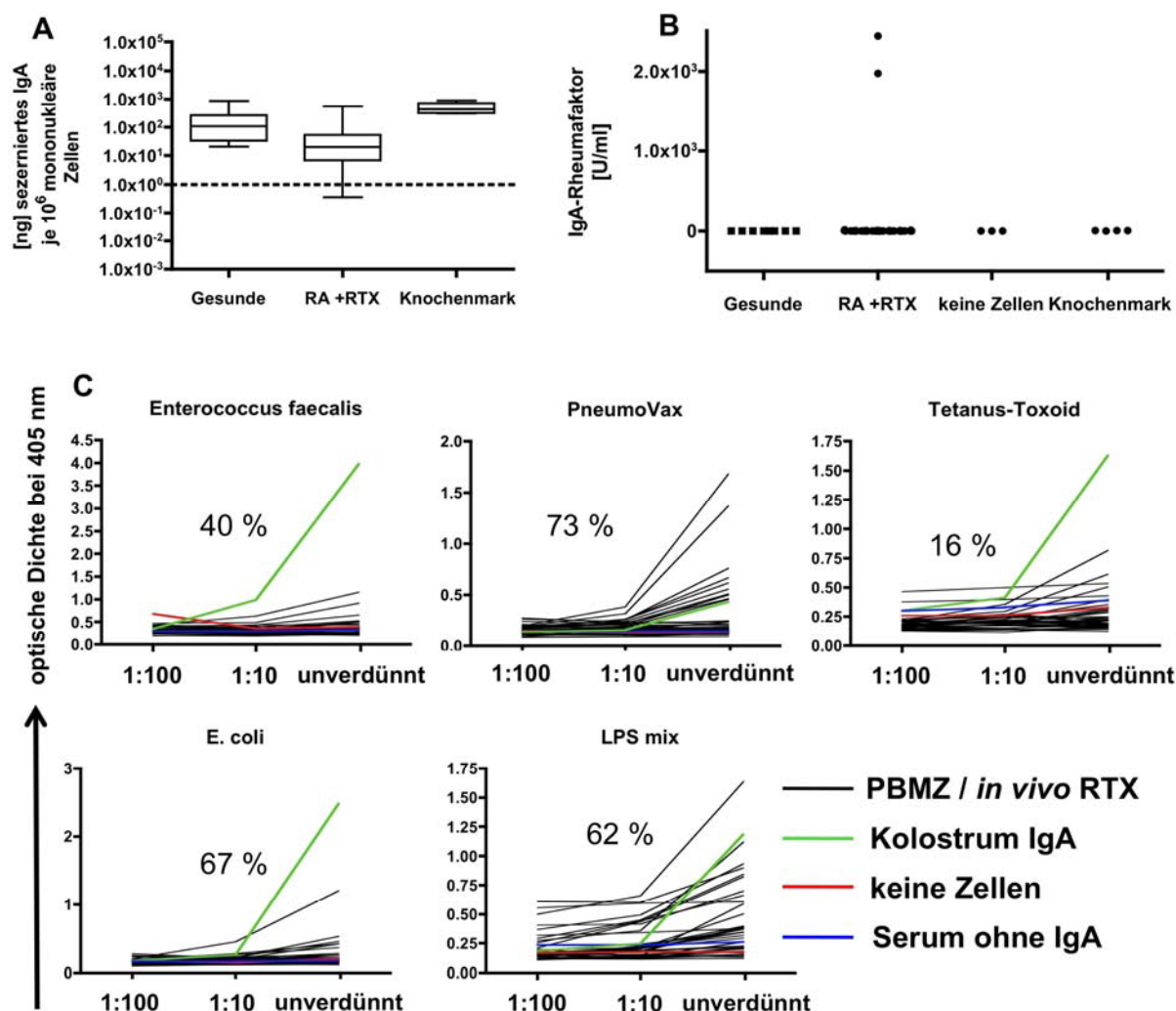
**Abb. 40: Funktioneller Nachweis migratorischer und proliferierender Plasmablasten im Blut B-Zell-depletierter RA-Patienten nach Rituximab-Behandlung.**

(A) Durchflusszytometrische Unterscheidung von HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten und HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen. (B) Kinetik von Plasmablasten und Plasmazellen im Blut B-Zell-depletierter Probanden. (C) *In vivo* Differenzierung *in vitro* migratorischer Plasmablasten unter B-Zell-depletierender Therapie. Unter den in die Migrationsversuche eingesetzten PBMZ wurden antikörpersezernierende Zellen durch EliSpot detektiert. Es wurden 5 Blutproben untersucht. Die Anzahl der eingesäten und migrierten antikörpersezernierenden Zellen wird unter der graphischen Abbildung angegeben. (D) Plasmablasten und Plasmazellen aus dem Blut B-Zell-depletierter Probanden wurden durch die simultane starke Expression von intrazellulärem Immunglobulin und CD27 identifiziert und auf die Expression von Ki-67 getestet. Dargestellt wird ein repräsentatives FACS-Histogramm der Ki-67 - Expression und die Frequenz Ki-67 - exprimierender Plasmablasten bei allen 7 getesteten Proben im Vergleich zur isotypengleichen Kontrollfärbung ( $p = 0,0156$ , Wilcoxon-Test).

#### 4.3.4 Reaktivität zirkulierender IgA-sezernierender Plasmablasten und Plasmazellen unter B-Zell-Depletion

Parallel zur Reduktion der Plasmablasten und Plasmazellen des peripheren Blutes unter B-Zell-Depletion wurde im Vergleich zu Kontrollproben Gesunder (insgesamt 8 Proben von 8 Probanden) eine um 72,3 % geringere spontane *in vitro* Produktion von Immunglobulin A in Zellkulturüberständen unstimulierter PBMZ von B-Zell-depletierten Patienten (insgesamt 37 Proben von 23 Patienten) festgestellt. PBMZ unter *in vivo* B-Zell-Depletion produzierten durchschnittlich 59 ng

IgA/10<sup>6</sup> PBMZ im Vergleich zu 213 ng IgA/10<sup>6</sup> PBMZ gesunder Probanden (p = 0,0112, Mann-Whitney-Test) (Abb. 41A).



**Abb. 41: Antigenbindungspotential der von zirkulierenden Plasmablasten und Plasmazellen unter B-Zell-Depletion spontan sezernierten IgA-Antikörper**

Zellkulturüberstände unstimulierter PBMZ von gesunden Probanden und B-Zell-depletierten RA-Patienten sowie von mononukleären Knochenmarkszellen als Positivkontrolle wurden auf die Anwesenheit von IgA (A), IgA-Rheumafaktor (B) sowie Bakterien bindenden IgA-Antikörpern getestet (nur B-Zell-depletierte Probanden gezeigt) (C). Gestrichelte Linie in (A) - Signal von Proben, bei denen keine Zellen eingesetzt waren. Eine Probe wurde als „positiv“, also Antikörper der getesteten Spezifität enthaltend, gewertet, wenn sie bei der unverdünnten Probe eine höhere optische Dichte als die Negativkontrolle aufwies. Der Anteil positiv getesteter Proben wird zu der jeweiligen Antigen-spezifität angegeben.

Zur Unterscheidung autoreaktiver versus homöostatischer Immunreaktionen als Basis der persistierenden (mukosalen) Plasmablasten wurden die PBMZ-Überstände auf IgA mit Rheumafaktoraktivität (IgA-RF) gegenüber Bindung bakterieller Antigene getestet. IgA-RF wurde in 2/37 (5,4 %) PBMZ-Überständen B-Zell-Depletierter detektiert, jedoch in keiner der 8 Kontrollproben (0 %) (Abb. 41B). Eine gegen

Bakterien gerichtete Bindungsaktivität von IgA konnte hingegen in allen PBMZ-Zellkulturüberständen von B-Zell-depletierten Patienten als auch bei Kontrollen festgestellt werden: jede einzelne enthielt IgA, das an mindestens eines der 4 getesteten bakteriellen Antigene oder Bakterien band. IgA-Bindung an *Enterococcus faecalis* wurde bei 40 % der B-Zell-depletierten Proben festgestellt (63 % der 8 Kontrollproben, ohne Abb.), an *E. coli* bei 67 % (100 % der Kontrollen), an ein Gemisch aus 23 Polysacchariden aus Pneumokokkenzellmembranen (Pneumovax) bei 73 % (100 % der Kontrollen), und an Lipopolysaccharide (LPS) bei 62 % (75 % der Kontrollen) (Abb. 41C). IgA aus humanem Kolostrum diente als Positivkontrolle und band an alle Antigene. Mit Ausnahme einzelner Proben war das Ausmaß der Bindung stets konzentrationsabhängig. Als Kontrollantigen wurde Tetanustoxoid verwendet, welches von 16 % der B-Zell-depletierten PBMZ-Überstände und 3/8 der Kontrollproben gebunden wurde. Wenn überhaupt, wurden Anti-TT-Antikörper deutlich seltener detektiert als Anti-LPS- oder Anti-Polysaccharid-Antikörper. Die Bindung an mehr als eines der getesteten Antigene wurde als Polyreaktivität der Probe erachtet. Dies wurde bei 34/37 Proben (92 %) unter B-Zell-Depletion und bei 8/8 Proben Gesunder (100 %) beobachtet.



## 5 Diskussion

Nach der Identifizierung von Plasmazellen 1948 [246] und ausgehend von der Erkenntnis, dass sie die Quelle spezifischer Antikörper und somit Träger humoraler Immunität sind, waren die Umstände ihrer Entstehung und Differenzierung (Diversifizierung der Antikörperrepertoires, Affinitätsreifung, Keimzentrumsreaktion, Zellnavigation, Eigenschaften der sezernierten Antikörper usw.) in den letzten 60 Jahren Gegenstand experimenteller Untersuchungen. Aufgrund derer wurde modellhaft angenommen, dass Plasmablasten, sind sie einmal entstanden, während ihres terminalen Reifungsprozesses zu Plasmazellen aus den sekundären lymphatischen Organen in das Blut emigrieren und von dort aus in das Knochenmark (oder andere Plasmazelldepots) einwandern, wo sie bis zu ihrem Tod verbleiben und Antikörper sezernieren [143, 157]. Konsistent mit der effektiven Induktion von Plasmablasten werden nach Immunisierungen langfristig persistierende, spezifische Antikörpertiter sowohl durch laborchemische Messungen als auch durch den Schutz der Geimpften vor entsprechenden Infektionen nachgewiesen.

Die Halbwertszeit muriner und humaner Immunglobuline beträgt *in vivo*  $\leq 3$  Wochen [110, 112], sodass die Antikörper selbst nicht als Träger dieses Gedächtnisses infrage kommen. Stattdessen wurde die Langlebigkeit antikörpersezernierender Plasmazellen als biologische Grundlage persistierender Antikörpertiter postuliert [5, 6]. Seitdem wächst die experimentelle Evidenz für eine essentielle Rolle langlebiger, nicht proliferierender Plasmazellen vor allem des Knochenmarks [122, 159] für die Aufrechterhaltung des humoralen Gedächtnisses [114, 120, 124], wobei der Umfang des Beitrags weiterer Mechanismen [56, 115] hierzu bisher nicht bestimmt wurde. Die Immunglobulinkonzentrationen im Blutserum sind bei gesunden Erwachsenen weitgehend konstant und betragen etwa 12 mg/ml IgG, 2 mg/ml IgA und 1 mg/ml IgM [20]. Die durchschnittlich konstante und unter individuellen Plasmazellen vergleichbare Antikörpersekretionsrate vorausgesetzt, spiegelt dies die Stabilität und homöostatische Regulation der Population langlebiger Plasmazellen wider. Daraus folgt, dass ihre Gesamtzahl begrenzt ist. Diese Anzahl wird vermutlich durch die Verfügbarkeit spezieller Mikroumgebungen, sogenannter Überlebensnischen, bestimmt [120, 140], in denen Plasmazellen mit löslichen und zellulären Faktoren am Leben erhalten werden [120, 140, 247-252][135]. Das humorale Gedächtnis und der

entsprechende Plasmazellpool sind in der Lage, neue Antigenspezifitäten aufzunehmen, beispielsweise im Rahmen von Immunisierungen oder schweren Infektionen. Gleichzeitig bleiben die Antikörpertiter anderer Spezifitäten weitgehend konstant. Folglich unterliegt die dem humoralen Gedächtnis zugrunde liegende Plasmazellfraktion einer strikten Regulation, deren Mechanismen bislang unaufgeklärt sind.

Dieser Sichtweise entsprechend müsste eine Immunisierung, die ein humorales Immungedächtnis erzeugt, Plasmablasten induzieren, die Eingang in die Population langlebiger Plasmazellen finden können. Die Regulation des humoralen Gedächtnisses könnte somit u. a. von der Anzahl und den Migrationseigenschaften neu generierter Plasmablasten sowie der Häufigkeit der eigentlichen Immunreaktionen abhängen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit beim Menschen unter verschiedenen Bedingungen untersucht:

- im Blut nach (gedächtnisausprägender) Tetanusimmunisierung unter Berücksichtigung der Antigenspezifität,
- im Blut während des Normalzustands (im immunologischen Gleichgewicht),
- im Blut von RA-Patienten unter therapeutischer B-Zell-Depletion sowie bei splenektomierten Probanden

und zum Vergleich den Eigenschaften von

- Plasmazellen des Knochenmarks (als Sitz langlebiger Plasmazellen)

gegenübergestellt.

### **5.1 Kinetik, Phänotyp und Migrationsverhalten antigenspezifischer Plasmablasten nach einer sekundären Tetanusimmunisierung**

Bisher wurden im Blut zirkulierende antikörpersezernierende Zellen beschrieben und ihre Antigenspezifität infolge von Immunisierungen analysiert [146, 147, 157, 174, 226, 232, 233, 253-265] bzw. deren Differenzierung aus naiven oder Gedächtnis-B-Zellen *in vitro* nachvollzogen [54, 56, 58, 60, 144, 250, 266-269]. Entsprechend ihrer Detektion im peripheren Blut gelten sie, insbesondere jedoch die antigenspezifischen Zellen, als migratorisches Intermediat zwischen den

Plasmablasten der sekundären lymphatischen Gewebe und reifen Plasmazellen der Plasmazelldepots beispielsweise im Knochenmark oder in der Lamina propria [143, 157, 226].

### 5.1.1 Nachweis antigenspezifischer B-Zellen nach einer Tetanusimmunisierung

Hier wurden nach *in vivo* Antigenstimulation mit Tetanustoxoid erstmals Anzahl, Phänotyp und Migrationsverhalten antigenspezifischer Plasmablasten untersucht. Plasmablasten und Plasmazellen wurden

- i) phänotypisch als  $CD19^+/CD27^{\text{stark}}/CD20^-$  Lymphozyten oder  $CD19^+/CD38^{\text{stark}}/CD20^-$  Lymphozyten,
- ii) anhand ihrer zytoplasmatischen Immunglobulinexpression als intrazellulär Immunglobulin<sup>stark</sup> PBMZ oder
- iii) als antikörpersezernierende Zellen mittels Elispot detektiert.

$CD19^+/CD27^{\text{stark}}/CD20^-$  Zellen exprimierten simultan stark CD38 und IgG und wurden per Elispot bereits vorher als antikörpersezernierende Zellen identifiziert [56, 214]. Die intrazelluläre Expression von Immunglobulin wurde als funktionelles Korrelat antikörpersezernierender Zellen nachgewiesen und zu deren Nachweis verwendet. IgG<sup>stark</sup> Lymphozyten koexprimierten stark CD27 und CD38, schwach CD19, nicht jedoch CD20. Insgesamt wurde die zuverlässige Detektion von Plasmablasten sowie Plasmazellen durch verschiedene, wechselseitig kontrollierte Nachweisverfahren bestätigt.

Die Spezifität für das Tetanusantigen wurde durch den durchflusszytometrischen Nachweis des Tetanusantigen-bindenden B-Zell-Rezeptors auf Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten bzw. durch den Nachweis Tetanusantigen-bindender zytoplasmatischer Antikörper bei Plasmablasten und Plasmazellen analysiert. Die Spezifität dieses Nachweisverfahrens für tetanusreaktive Plasmablasten wurde abgesichert durch

- i) die Blockierung der Nachweisreaktionen durch kompetitive Inkubation mit unkonjugierten Nachweisreagenzien,

- ii) die Blockierung der Nachweisreaktion durch Auslassung der Zellmembranpermeabilisierung,
- iii) die Korrelation der Anzahl tetanusspezifischer Plasmablasten, die simultan experimentell mittels Elispot und FACS bestimmt wurde, sowie
- iv) den Nachweis des Plasmablasten entsprechenden Phänotyps tetanusspezifischer Zellen 7 Tage nach Tetanusimmunisierung.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen exprimierten sie den Phänotyp  $CD19^+/CD20^-/CD27^{\text{stark}}/CD38^{\text{stark}}/IgD^-/HLA-DR^{\text{stark}}/FSC^{\text{verstärkt}}$  [157, 158, 232, 270].

In verschiedenen Experimenten wurde simultan die Expression von CD138 erfasst. Dessen starke Expression wird während der Plasmazelldifferenzierung induziert [60] und ist unter den reifen Lymphozyten einzigartig, sodass diese Messungen als zusätzliche Bestätigung der zuverlässigen Detektion von Plasmablasten und Plasmazellen eingesetzt wurden. CD138 wird jedoch weder vor noch nach einer Tetanusimmunisierung von allen Plasmablasten oder Plasmazellen im Blut exprimiert. Daher würde die Nutzung der CD138-Expression als „Plasmazellmarker“ im Blut zu niedrige gemessene Plasmazellzahlen ausweisen. Die genaue Rolle der CD138-Expression bei Plasmablasten und Plasmazellen im Blut ist bisher unklar. Bei Plasmazellen des Knochenmarks, die sämtlich CD138-positiv sind, kann CD138 deren Adhäsion an Kollagen vom Typ I vermitteln [271].

### 5.1.2 Anzahl und Kinetik tetanusspezifischer Plasmablasten im peripheren Blut

Im immunologischen Gleichgewichtszustand zirkulieren sehr wenige IgG-sezernierende Zellen durch das Blut, durchschnittlich 346/ml (15 % von 2.307/ml). Diese Größenordnung stimmt mit früheren Analysen überein [56, 174]. Unter diesen Bedingungen wurden keine bzw. sehr wenige tetanusspezifische Zellen durchflusszytometrisch oder mittels EliSpot detektiert. Ob diese wenigen Zellen tatsächlich tetanusspezifisch waren, kann nicht abschließend bestätigt werden, da die Messwerte nahe der Detektionsgrenze lagen.

Bis Tag 5 und ab Tag 9 nach einer Tetanusimmunisierung wurden mithin keine oder ggf. nur wenige antigenspezifische Zellen nachgewiesen. Lediglich 6 - 8 Tage nach der Immunisierung wurde eine Welle IgG-sezernierender Zellen im Blut



beobachtet, die nun 80 % aller zirkulierenden Plasmablasten und Plasmazellen ausmachte. Diese IgG-sezernierenden Zellen enthielten Plasmablasten, die spezifisch für das Impfantigen Tetanustoxoid waren. Letztere wiesen stets nur an einem Tag (Tag 6, 7 oder 8 nach Immunisierung) eine maximale Frequenz auf, sodass der Egress dieser Zellen aus den sekundären lymphatischen Organen streng reguliert ist und die Halbwertszeit der frisch emigrierten Plasmablasten im Blut mit (höchstens) 1 Tag bestimmt werden kann. 7 Tage nach der Immunisierung betrug die durchschnittliche Anzahl tetanustoxoidspezifischer Zellen 1.056/ml Blut. Dies war vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Labore [56, 235].

Als Kennzeichen einer systemischen, T-Zell-abhängigen Gedächtnisantwort auf ein Proteinantigen exprimierten fast alle antigenspezifischen Plasmablasten IgG mit hochmutierten  $V_H$ -Gen-Rearrangements, vor allem des Subtyps IgG<sub>1</sub> (> 90 %, unveröffentlicht; Giesecke, Mei und Dörner). *In vivo* generiertes tetanusspezifisches Immunglobulin weist eine ähnliche Ig-Subklassenverteilung auf [272, 273]. Dies ist konsistent mit der Annahme, dass die hier analysierten tetanusspezifischen Plasmablasten tatsächlich die Vorläufer derjenigen Plasmazellen sind, die das humorale tetanusspezifische Immungedächtnis tragen. Die gelegentliche Induktion tetanusspezifischer IgA<sup>+</sup> Plasmablasten kann durch die Aktivierung präexistenter, rezirkulierender tetanusspezifischer IgA<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen oder durch die Absiedlung tetanusantigenbeladener antigenpräsentierender Zellen in mukosale Gewebe erklärt werden. Das mukosale Zytokinmilieu induziert spezifisch den Ig-Klassenwechsel zu IgA [274], beispielsweise durch *transforming growth factor-β* (TGF-β), welches von vielen Zelltypen, u. a. aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, in mukosalen Geweben gebildet wird [275], und könnte daher die Differenzierung einiger tetanusspezifischer IgA<sup>+</sup> Plasmablasten ermöglichen (5.3.1).

Tetanusspezifische CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen wurden im Vergleich zu tetanusspezifischen Plasmablasten später und mit einer anderen Kinetik in das Blut entlassen. Ihre nach der Immunisierung über Wochen fortgesetzte Zirkulation [152] spiegelt die Ausprägung des reaktiven Arms des B-Zell-Gedächtnisses wider und dient vermutlich der Verteilung tetanusspezifischer aktivierbarer B-Zellen über die Immungewebe. Anhand ihrer *in vitro* Differenzierung zu Plasmazellen durch Stimulation mit Tetanustoxoid werden auch Jahre nach einer sekundären Tetanusimmunisierung rezirkulierende antigenspezifische Gedächtnis-B-Zellen

nachgewiesen [268].

### 5.1.3 Migrationsziel tetanusspezifischer Plasmablasten

Übereinstimmend mit der Klassifizierung tetanusspezifischer Plasmablasten als migratorisches Intermediat auf dem Weg in das Knochenmark [157] exprimieren diese CXCR4 und werden von dessen Liganden CXCL12 *in vitro* attrahiert. Diese Funktion ist, wie im Tiermodell gezeigt, *in vivo* wichtig für die Migration von Plasmablasten in das Knochenmark [129, 200][276] und wurde hier erstmals für systemisch induzierte, humane Plasmablasten nachgewiesen. *In vivo* konnte die Ankunft der antigenspezifischen Plasmablasten im Knochenmark jedoch nicht experimentell nachvollzogen werden. In Anbetracht vergleichbarer Ergebnisse bei Mäusen erscheint die Immigration dieser Plasmablasten in das Knochenmark jedoch wahrscheinlich [5, 69, 129, 132]. Übereinstimmend mit dieser Sichtweise wurde gezeigt, dass insbesondere im Rahmen T-Zell-abhängiger Immunantworten (wie einer Tetanusimmunisierung) generierte Plasmablasten in das Knochenmark migrieren [277, 278].

In chimären Mäusen, die mit einem CXCR4-defizienten Immunsystem rekonstituiert wurden, wandern Plasmazellen nicht regulär in das Knochenmark, sondern akkumulieren in den peripheren lymphoiden Geweben und im Blut [200]. Demgegenüber ist die ektopische Expression von CXCL12 im Pankreas hinreichend für die lokale Akkumulation von Plasmazellen [201]. Die Proteinexpression von CXCR4 auf humanen tetanusspezifischen Plasmablasten ist schwach [152], was jedoch in den vorliegenden Analysen nicht mit einer eingeschränkten Funktionalität des Rezeptors einherging. Hinsichtlich der Divergenz von Expressionsstärke und Funktionalität von CXCR4 wurde ein ähnliches Phänomen bereits zuvor anhand früher B-Zell-Differenzierungsstadien im Knochenmark beschrieben [219].

CXCL12 wird ferner konstitutiv in mehreren Immungeweben exprimiert [197, 279], sodass auf die wahrscheinliche Beteiligung weiterer Mechanismen und Moleküle an der spezifischen Migration von Plasmablasten in das Knochenmark geschlossen werden kann.

Neben tetanusspezifischen Plasmablasten migrieren auch nicht-tetanusspezifische Plasmablasten gegen CXCL12. Diese exprimieren den Phänotyp kürzlich generierter

Plasmablasten:  $CD19^+/CD27^{stark}/CD20^-/CD138^{+/-}/Ki-67^+/HLA-DR^{stark}/CD62L^+$ . Sie repräsentieren daher vermutlich Plasmablasten, die als Antwort gegen andere Impfstoffbestandteile, beispielsweise Diphtherietoxoid, generiert wurden.

Wie zuvor bei Mäusen analysiert [129], exprimieren auch humane Plasmazellen im Knochenmark stark CXCR4, migrieren jedoch zu > 99 % nicht gegen CXCL12. Nur einzelne antikörpersezernierende Zellen des Knochenmarks migrierten *in vitro* gegen CXCL12 (< 0,6 %). Diese exprimierten HLA-DR stärker als andere, nicht-migrierende Plasmazellen aus derselben Probe und qualifizieren sich dadurch als kürzlich immigrierte Plasmablasten.

In Analogie zu murinen Knochenmarksplasmazellen, bei denen die Bindung von CXCL12 nicht zu deren *in vitro*-Migration, sondern zu verlängertem *in vitro*-Überleben führt [129, 140], könnte das differentielle Überleben humaner Knochenmarksplasmazellen durch die lokale Konzentration von CXCL12 reguliert werden. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint die Vielfalt der Einflüsse auf die offensichtlich sehr flexible Expression von CXCL12 im Knochenmark, beispielsweise durch Faktoren des Nervensystems [280] und des Entzündungsprozesses [281] oder als Funktion des zirkadianen Rhythmus [282], interessant. Die Regulation der CXCL12-Expression spielt möglicherweise eine Schlüsselrolle, da sie

- die Rekrutierung migratorischer Plasmablasten beeinflusst,
- das Überleben reifer Plasmazellen direkt fördert [140] und
- andere, gegen CXCL12-Gradienten migrierende Zellen in die räumliche Nähe zu Plasmazellen bringt [139], die wiederum lokal einen Einfluss auf individuelle Plasmazellen nehmen könnten.

Antigenspezifische Plasmablasten nach einer Tetanusimmunisierung exprimieren den Lymphknotenadhäsionsrezeptor CD62L (L-Selektin) [165]. CD62L-exprimierende Zellen können mit *peripheral lymph node addressin* (PNAd) interagieren, welches in den postkapillären Venolen des hohen Gefäßendothels von Lymphknotengewebe exprimiert wird [164, 165]. *In vivo* würde dies den Plasmablasten die Initiation des Gewebeimmigrationsprozesses (Abb. 5) erlauben. *In vitro* migrierten lediglich  $CD62L^+$  Plasmablasten, einschließlich tetanusspezifischer Plasmablasten, gegen CXCL12, nicht aber andere Plasmablasten oder Plasmazellen. Folglich liegen bei tetanusspezifischen

CD62L<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> Plasmablasten zwei wichtige Voraussetzungen für die Gewebeimmigration vereint vor, die möglicherweise synergetisch den Eintritt in das Knochenmark vermitteln.

Knochenmarksplasmazellen exprimierten kein CD62L, wobei dies jedoch nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit einer systemischen Immunreaktion untersucht wurde. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass gerade erst immigrierte tetanusspezifische Plasmablasten im Knochenmark CD62L exprimieren können und dessen Expression während der finalen Reifung verloren geht. Andererseits könnte CD62L auch während des Transmigrationsprozesses in das Knochenmark abgeschert werden (*shedding*) [283].

Tetanusspezifischen Plasmablasten im Blut fehlt die Expression von CCR10 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, die wesentlich an der spezifischen Zellmigration in mukosale und innerhalb mukosaler Gewebe beteiligt sind (5.3.1), sodass die Zellen höchstwahrscheinlich nicht in die mukosalen Plasmazelldepots einwandern.

Humane tetanusspezifische Plasmablasten exprimieren, wie murine Plasmablasten, CXCR3 und wandern *in vitro* gegen CXCL9. Die Migration von Plasmablasten gegen dieses proinflammatorische Chemokin würde analog zu murinen Plasmablasten [129, 202, 204] (Hoyer, Panne und Hiepe, Manuskript in Revision) ihre Einwanderung in entzündete Gewebe erlauben [231]. Im Verlauf der Plasmazelldifferenzierung hängt die Expression von CXCR3 von Interferon- $\gamma$  ab [144], welches im Rahmen einer Follikelreaktion von Th1-Zellen ausgeschüttet wird [284, 285]. Im Knochenmark exprimieren Plasmazellen kein CXCR3. Dies weist darauf hin, dass CXCR3<sup>+</sup> Plasmablasten entweder

- i) nicht in das Knochenmark, sondern in andere Gewebe einwandern, oder
- ii) die Expression von CXCR3, anders als die von CXCR4, im Knochenmark verloren geht.

Die Dichotomie mukosalen versus parenteralen Migrationsverhaltens (5.3.4) könnte durch die entzündungsinduzierte Expression von CXCR3-Liganden in mukosalen Geweben und die Expression von CXCR3 auf Plasmablasten überbrückt werden.

Auf Grundlage dieser Indizien findet die Migration tetanusspezifischer Plasmablasten mit hoher Wahrscheinlichkeit in das Knochenmark und mit geringer Wahrscheinlichkeit in mukosale Gewebe statt.

## 5.2 Stöchiometrische Mobilisierung HLA-DR<sup>schwach</sup> exprimierender Plasmazellen durch migratorische tetanusspezifische HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten

### 5.2.1 *Simultaner Nachweis antigenspezifischer Plasmablasten und polyklonaler Plasmazellen im peripheren Blut nach einer Tetanusimmunisierung*

Wie soeben beschrieben, wird im Rahmen einer Tetanusimmunisierung die Differenzierung antigenspezifischer B-Zellen induziert. Während dieses Differenzierungsprozesses beginnen sie, noch in dem Gewebe, wo sie generiert wurden, lösliche Antikörper mit der Spezifität des membranständigen B-Zell-Rezeptors zu sezernieren. Solche Zellen wurden bereits zuvor als Plasmablasten klassifiziert, z. B. als proliferierende IgG<sup>+</sup> Zellen in der Tonsille [159] mit hoher Expression von HLA-DR [286]. 6 - 8 Tage nach einer sekundären Tetanusimmunisierung verlassen diese Plasmablasten die sekundären lymphatischen Gewebe und sind im Blut nachweisbar, was sich in dem Verlust der Expression von CXCR5, CCR6 und CCR7 widerspiegelt [151]. 7 Tage nach einer Tetanusimmunisierung sind tetanusspezifische Plasmablasten im Blut

- i) antigenspezifisch,
- ii) exprimieren den Phänotyp CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD38<sup>stark</sup>/CD138<sup>+/-</sup>/CD20<sup>-</sup>,
- iii) exprimieren CD62L,
- iv) exprimieren den Proliferationsmarker Ki-67 und
- v) CD95<sup>stark</sup> sowie
- vi) HLA-DR<sup>stark</sup> und
- vii) migrieren *in vitro* gegen CXCL12.

Sie wandern in das Knochenmark, wo sie zu reifen Plasmazellen differenzieren. Plasmazellen im Knochenmark sezernieren ebenfalls Antikörper, sind polyklonal, proliferieren nicht (Ki-67<sup>-</sup>), migrieren nicht gegen CXCL12 und exprimieren den Phänotyp CD19<sup>+/-</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD38<sup>stark</sup>/CD138<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>schwach</sup>/CD95<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup>.

Bisher wurde dieser Differenzierungsvorgang als Prozess angesehen [143, 157], bei dem das Blut als Transitorgan für Plasmablasten dient, die später als reife Plasmazellen bis zu ihrem Tod in ihren Depots im Knochenmark verweilen. Dementsprechend wurde der Nachweis antikörpersezernierender Zellen im Blut bzw. im Knochenmark stets als mit deren Differenzierungsstadium als Plasmablast bzw. Plasmazelle verknüpft angesehen [157].

In dieser Arbeit wird erstmals beschrieben, dass sich im menschlichen Blut, stets

gleichzeitig und funktionell voneinander abgrenzbar, Plasmablasten und Plasmazellen nachweisen lassen. Solche Plasmazellen im Blut nach einer Tetanusimmunisierung i) sind nicht tetanusspezifisch (vermutlich multispezifisch), ii) exprimieren den Phänotyp  $CD19^+/CD27^{\text{stark}}/CD38^{\text{stark}}/CD138^-/CD20^-$ , iii) exprimieren weder CD62L noch iv) Ki-67, jedoch v)  $CD95^{\text{sehr stark}}$ , vi)  $HLA-DR^{\text{schwach}}$  und vii) migrieren nicht gegen CXCL12. In diesen Eigenschaften ähneln sie phänotypisch und funktionell reifen Plasmazellen des Knochenmarks und werden daher in dieser Arbeit als erneut zirkulierende, reife Plasmazellen interpretiert.

### *5.2.2 Stöchiometrische Mobilisierung reifer Plasmazellen durch frisch generierte Plasmablasten*

Die  $HLA-DR^{\text{schwach}}$  Plasmazellen im Blut Immunisierter stellen vermutlich aus dem Gewebe mobilisierte, reife Plasmazellen dar, die im Rahmen der Immunisierungsreaktion in das Blut verdrängt wurden (Abb. 42). Das Zahlenverhältnis kürzlich generierter  $HLA-DR^{\text{stark}}$  Plasmablasten und reifer  $HLA-DR^{\text{schwach}}$  Plasmazellen im Blut war vor und 7 Tage nach einer Immunisierung ähnlich, wobei jedoch ihre Frequenz nach Immunisierung transient deutlich erhöht war. Diese Erhöhung war bei den verschiedenen Probanden unterschiedlich stark, korrelierte jedoch immer zwischen Plasmablasten und Plasmazellen. Das gleichzeitige Auftreten „mobilisierter“ Plasmazellen und antigenspezifischer, kürzlich generierter Plasmablasten in etwa gleicher Anzahl weist darauf hin, dass im Knochenmark ansässige, höchstwahrscheinlich ältere Plasmazellen im Verlauf einer sekundären, systemischen Immunantwort verdrängt werden. Dies würde die Aufnahme neuer, im Rahmen der stattfindenden Immunreaktion gebildeter Plasmablasten in die begrenzte Menge der vermutlich langlebigen Plasmazellen ermöglichen.

Die stöchiometrische Mobilisierung von Plasmazellen durch Plasmablasten (Abb. 42), die bei einer Immunantwort gegen ein definiertes Antigen generiert werden, weist auf einen Adaptionsmechanismus des humoralen, von langlebigen Plasmazellen getragenen Gedächtnisses hin. Dabei hängen Umfang und Häufigkeit dieser Art Anpassung von der Umgebung des Individuums mit ihren antigenischen Reizen ab [116, 287]. Dieses Konzept kann die Adaption des humoralen

Gedächtnisses im Rahmen systemischer Immunantworten erklären und steht im Einklang mit der offensichtlichen Flexibilität des humoralen Gedächtnisses und seiner Fähigkeit, neue Spezifitäten aufzunehmen.

Ein alternatives Konzept der Anpassung bzw. Selbsterneuerung des humoralen Gedächtnisses basiert auf der polyklonalen Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen durch Zytokine und Signale des angeborenen Immunsystems (TLR-Liganden) [56], der sogenannten *bystander*-Aktivierung. Die hier vorgestellten Experimente können keinen hinreichenden Aufschluss über den Beitrag dieses Mechanismus zur Aufrechterhaltung des humoralen Gedächtnisses geben, aus ihnen ergibt sich jedoch eine andere Erklärung für die Beobachtungen von Bernasconi et al. [56]: Infolge einer sekundären Tetanusimmunisierung, wie sie in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde, zirkulieren *in vivo* neben tetanusspezifischen Plasmablasten simultan polyklonale antikörpersezernierende Zellen, die das Repertoire des humoralen Gedächtnisses repräsentieren [56]. Analog dazu wurden in dieser Arbeit nach einer Tetanusimmunisierung Hepatitis-B-spezifische antikörpersezernierende Zellen im Blut nachgewiesen. Die Produktion dieser polyklonalen antikörpersezernierenden Zellen durch *bystander*-Aktivierung kann nicht ausgeschlossen werden, da sich solche Zellen *ex vivo* durch Interleukin (IL)-15, Anti-Ig und CpG-Oligonukleotide aus Gedächtnis-B-Zellen darstellen lassen [56]. Es wurde jedoch nicht bestimmt, ob es sich dabei um migratorische Plasmablasten oder mobilisierte Plasmazellen handelt. Ggesetzt den Fall, es handelte sich um mobilisierte Plasmazellen, könnten diese polyklonalen Zellen nicht ins Knochenmark zurückkehren und daher nicht zum humoralen Gedächtnis beitragen. Vielmehr würden sie Plasmazellen repräsentieren, die dem Plasmazellpool des humoralen Gedächtnisses bereits verloren gegangen sind.

Könnten sich neu gebildete Plasmablasten, die im Rahmen einer spezifischen, parenteralen Immunreaktion induziert wurden, im Knochenmark auf Kosten älterer, polyklonaler Plasmazellen etablieren, würde dies für die präexistierenden Spezifitäten einen nur minimalen Verlust bedeuten, etwa ein Tausendstel einer jeden Spezifität [288] (Abb. 42). In einem mathematischen Modell wurde die hieraus resultierende Halbwertszeit für die Menge der tetanusspezifischen IgG<sup>+</sup> Plasmazellen mit etwa 10 Jahren bestimmt [288], was sich mit der experimentell bestimmten

Halbwertszeit der Anti-Tetanus-IgG-Titer im Blutserum von etwa 11 Jahren [114] deckt.

### 5.2.3 Unterschiedliche Kompetenz von Plasmablasten zur Gedächtnisausbildung

Insgesamt scheint nicht jeder zirkulierende migratorische Plasmablast dieselbe Kompetenz zu besitzen, in das Gedächtnis einzugehen und dabei (langlebige) Plasmazellen zu mobilisieren. Neben der örtlichen Separation von Plasmablasten aus systemischen und mukosalen Immunantworten durch gewebsspezifisches Migrationsverhalten ist die Existenz weiterer, bisher unbekannter Mechanismen zur Regulation der Entität langlebiger Plasmazellen anzunehmen.

Bei Patienten mit SLE liegt eine Überproduktion systemischer Plasmablasten vor, die durch autoreaktive Immunantworten bedingt ist [158, 214, 270, 289]. In ihrem Blut sind etwa 85 % HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten neben 15 % HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen nachweisbar [289]. Hingegen beträgt dieses Verhältnis bei Gesunden vor und 7 Tage nach einer Tetanusimmunisierung etwa 50 % zu 50 %. Überschüssige periphere Plasmablasten migrieren effizient in das Knochenmark der SLE-Patienten, wie durch die dort fortgesetzte Überpräsenz von Plasmablasten deutlich wird [289]. Der kontinuierliche Einstrom systemisch induzierter Plasmablasten führt jedoch nicht zum Verlust des humoralen (protektiven) Gedächtnisses [290, 291]. Dies belegt, dass neben der migratorischen Kompetenz weitere Regulationsmechanismen die Selektion von Plasmablasten in die Population gedächtnisvermittelnder, langlebiger Plasmazellen bestimmen.

### 5.2.4 Das Schicksal mobilisierter Plasmazellen

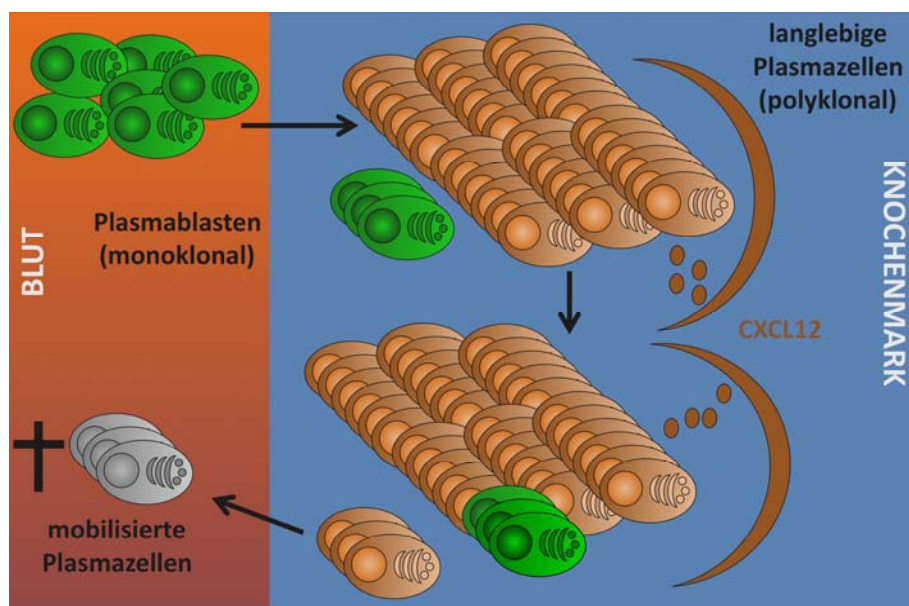
CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen im Blut wandern nicht mehr gegen CXCL12 und proliferieren nicht. Aufgrund dieser Gegebenheiten können sie wahrscheinlich weder in das Knochenmark noch in andere Plasmazelldepots zurückkehren oder erneut Funktionen von Plasmablasten ausüben. Mobilisierte Plasmazellen exprimieren im Vergleich zu Plasmablasten erhöhte Spiegel des Apoptosemarkers CD95. Zudem bedeutet die quantitative Produktion von Antikörpern einen signifikanten Stress im endoplasmatischen Retikulum, der bei



Plasmazellen zum Zelltod führen kann, wenn er nicht durch Überlebenssignale, wie beispielsweise den Faktoren der Überlebensnische, ausbalanciert würde [120, 141]. Folglich sterben aus dem Blut Tetanusimmunisierte isolierte HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen *in vitro* innerhalb eines Tages (Mei und Yoshida, Hiepe, Dörner, Radbruch, Manuskript in Vorbereitung) bzw. *in vitro* generierte Plasmazellen innerhalb von zwei Tagen [141].

Sukzessive Immunisierungen mit verschiedenen Antigenen bewirken bei Mäusen die Reduktion der Antikörpertiter der zuerst geimpften Spezifität nach Immunisierung mit dem zweiten Antigen [142]. Dies stimmt mit der Sichtweise überein, dass im Rahmen der zweiten Immunreaktion antigenspezifische Plasmazellen der ersten Immunreaktion mobilisiert werden und infolge dessen sterben. Diese Reduktion systemischer spezifischer Antikörpertiter infolge einer sukzessiven Immunisierung demonstriert *in vivo*, dass mobilisierte Plasmazellen auch nicht an anderer Stelle im Körper überdauern können.

Infolge ihrer Dislozierung aus den Überlebensnischen sind mobilisierte HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen vermutlich apoptoseanfällig und sterben im peripheren Blut (Abb. 42).



**Abb. 42: Schematische Darstellung der Mobilisierungshypothese.**

### *5.2.5 Der Mechanismus der Plasmazellmobilisierung*

Als eine Kritik an der Mobilisierungshypothese kann der bisher unverstandene Mechanismus gelten, der der Mobilisierung von Plasmazellen zugrunde liegt.

Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen Daten wäre die konditionelle Mobilisierung reifer Plasmazellen durch in das Knochenmark immigrierende Plasmablasten denkbar. Demnach würden neu generierte Plasmablasten lokal mit residenten Plasmazellen um Überlebensfaktoren konkurrieren, wobei die „Verliererzellen“ dieser Konkurrenzsituation in stochastischer Verteilung aus dem Gewebe in das Blut ausgeschwemmt werden würden (Kompetition um Überlebensnischen) [120].

Alternativ könnte die Mobilisierung residenter Plasmazellen aus dem Knochenmark durch lösliche Faktoren gesteuert werden, sodass bereits geleerte Plasmazellnischen im Knochenmark einwandernde Plasmablasten aufnehmen können [292]. Dies wurde im Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose bei Plasmazellen via CD32 durch IgG-Immunkomplexe postuliert [142], wäre jedoch auch im Rahmen einer Entzündungsreaktion durch die transient reduzierte Expression von CXCL12 als Plasmazellüberlebensfaktor denkbar [281] (5.1.3).

## **5.3 Zirkulierende Plasmablasten und Plasmazellen im immunologischen Ruhezustand**

Nicht nur nach einer sekundären Tetanusimmunisierung, sondern auch im immunologischen Gleichgewichtszustand (Ruhephase) konnten jederzeit zirkulierende Plasmablasten und Plasmazellen im Blut nachgewiesen werden. In den hier beschriebenen Versuchen wurden Plasmablasten und Plasmazellen im immunologischen Gleichgewichtszustand analysiert, um ihre bisher ungeklärte Beziehung zu den reifen, dem humoralen Gedächtnis zugrunde liegenden Plasmazellen im Knochenmark zu untersuchen.

### 5.3.1 Chronische Produktion mukosaler Plasmablasten im immunologischen Gleichgewicht

Bereits früher wurden antikörpersezernierende Zellen im Blut gesunder Probanden (ohne Immunisierung) phänotypisch beschrieben. Dabei wurden IgG-sezernierende Zellen in geringer Frequenz nachgewiesen [56, 235], jedoch nicht im Detail analysiert. Aufgrund der heterogenen Expression von CD38 und HLA-DR wurde spekuliert, ob CD38<sup>schwach</sup> IgG-sezernierende Zellen Plasmablasten sein könnten [174, 269]. Zirkulierende CD19<sup>schwach</sup>/IgA<sup>schwach</sup> Lymphozyten wurden ebenfalls nachgewiesen und ihr mukosaler Ursprung angenommen [253]. In Übereinstimmung mit dieser Ansicht, produzieren PBMZ spontan und nach *in vitro* Stimulation mit *pokeweed mitogen* sekretorisches (polymeres) IgA [154, 160-162]. Die Zirkulation von Plasmablasten (oder Plasmazellen) vor einer Immunisierung konnte bei Mäusen durch den Nachweis von GFP<sup>+</sup>/CD138<sup>+</sup> Lymphozyten im murinen Blut von *blimp-1<sup>gfp</sup>*-Mäusen belegt werden [153].

In dieser Arbeit wurden der Phänotyp und das migratorische Potential von im immunologischen Gleichgewichtszustand generierten Plasmablasten im Vergleich zu zirkulierenden IgG<sup>+</sup> Plasmablasten nach Tetanusimmunisierung untersucht, um ihren Ursprung und ihr Migrationsziel zu bestimmen.

Im Gleichgewichtszustand (Ruhephase) zirkulierten  $11,5 \times 10^6$  antikörpersezernierende Zellen in 5 Litern Blut. Vergleichsweise wurde die Zahl der Plasmazellen im Knochenmark auf  $5,5 \times 10^8$  und die der Plasmazellen in mukosa-assoziierten Immungewebe auf  $6,5 \times 10^9 - 7 \times 10^{10}$  approximiert [293, 294] (Rechnung 1). Dabei wird insbesondere die Anzahl der Lymphozyten (und Plasmazellen) in der Mukosa kontrovers diskutiert [295, 296]. Anders als tetanusspezifische Plasmablasten nach Tetanusimmunisierung, exprimieren über 80 % der beobachteten Plasmablasten und Plasmazellen während der Ruhephase IgA,  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin oder CCR10. Dies weist darauf hin, dass die meisten, wenn nicht alle während der Ruhephase generierten zirkulierenden Plasmablasten und Plasmazellen aus mukosalen Immunreaktionen stammen:

Der spezifische Ig-Klassenwechsel zu IgA findet hauptsächlich im Rahmen mukosaler Immunreaktionen statt. Er wird zum Beispiel durch TGF- $\beta$  im Rahmen T-Zell-abhängiger Immunantworten vermittelt [274, 297-299]. Dendritische Zellen und Epithelzellen synthetisieren u. a. APRIL und aktivieren TGF- $\beta$  auch im Rahmen

bakteriell induzierter Immunantworten, was ebenfalls zum IgA-Klassenwechsel führt [300-305]. Insbesondere wird durch TGF- $\beta$  nicht nur der IgA-Klassenwechsel induziert, sondern gleichzeitig der Klassenwechsel zu IgG unterdrückt [297]. Entsprechend exprimieren 80 - 90 % der Plasmazellen im mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe IgA, nur 10 - 15 % IgG [306].

In der Ruhephase exprimieren zirkulierende Plasmablasten bzw. Plasmazellen, insbesondere solche mit der Expression von IgA,  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR10. Die Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin ermöglicht die Adhäsion und die Initiation der transendothelialen Zellmigration in den postkapillären Venolen des Mukosagewebes durch Interaktion mit *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1* (MadCAM-1) [176, 177, 237][175].  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin wird daher als Leitmolekül für die Zellmigration in mukosale, MadCAM-1 exprimierende Gewebe angesehen [143, 178, 179, 186]. Folglich wird insbesondere die Akkumulation von IgA<sup>+</sup> Plasmazellen in der Lamina propria von Mäusen gestört, die kein MadCAM-1 exprimieren können [307]. Die Antigenkonfrontation an mukosalen Oberflächen (Immunisierung oder Infektion) induziert zirkulierende IgA-sezernierende Zellen, die CCR10 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin exprimieren [154, 226, 263, 308]. Damit einhergehend ist die Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin essentiell für die erfolgreiche Immunabwehr gegen Rotaviren bei Mäusen [309-311].

Die Expression von CCR10 durch differenzierende B-Zellen wird während mukosaler Immunreaktionen der Atemwegs- und Magen-Darm-Trakt-assoziierten Gewebe induziert und vermittelt Chemotaxis entlang seiner Liganden CCL28 [187-191, 238, 312] und CCL27 [239, 313]. Dabei wird CCL27 in der Haut, CCL28 in mukosalen Geweben, den Milchdrüsen und der Haut gebildet [187, 239, 313, 314]. In der Ruhephase migrieren etwa die Hälfte aller Plasmablasten gegen CCL28 *in vitro*, sodass die Expression von CCR10 zumindest bei diesen (migrierten) Zellen funktionell ist.

Darüber hinaus begünstigt die Anwesenheit von CCL28 die Bindung von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin an MadCAM-1 [315]. Dies deutet darauf hin, dass CCR10<sup>+</sup>/ $\alpha_4\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup> Plasmablasten einen selektiven Vorteil bei der Einwanderung in MadCAM-1<sup>+</sup> mukosale Gewebe haben könnten. Die *in vitro* Differenzierung aktivierter B-Zellen unter Einfluss von IL-21/TGF- $\beta$  bzw. Retinolsäure/IL-5 oder IL-6 erzeugt genau solche IgA<sup>+</sup> Plasmablasten, die sowohl CCR10 als auch  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin

exprimieren [297, 302]. In Übereinstimmung damit sezernieren antikörpersezernierende Zellen im Blut im immunologischen Gleichgewicht sekretorisches IgA [161]. Diese IgA-Antikörper binden spezifisch bakterielle Antigene oder Bakterien, sodass die Produktion der ihnen zugrunde liegenden IgA<sup>+</sup> Plasmablasten im Rahmen bakteriell induzierter Immunantworten angenommen wird [300, 303, 305, 316, 317].

Der intestinale Chemokinrezeptor CCR9 [192, 193] konnte weder phänotypisch noch funktionell bei Plasmablasten und Plasmazellen im Blut oder im Knochenmark nachgewiesen werden. CCR9 [318] wird von IgA<sup>+</sup> Lymphozyten der mesenterischen Lymphknoten und Peyer'schen Plaques exprimiert und dient rotaviruspezifischen IgA<sup>+</sup> Plasmablasten für die Migration gegen CCL25, welches von Epithelzellen der Lamina propria exprimiert wird [192, 193, 308]. Dies weist darauf hin, dass die hier beobachteten IgA<sup>+</sup> Plasmablasten nicht innerhalb der Peyer'schen Plaques oder den mesenterischen Lymphknoten des Dünndarmgewebes, sondern anderswo im mukosalen Gewebe entstanden sind oder die Umstände ihrer Differenzierung nicht zur Expression von CCR9 geführt haben [319].

Die Migration in die mukosale Lamina propria wird daher bei den hier beschriebenen IgA<sup>+</sup> Plasmablasten durch CCR10/CCL28 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin/MadCAM-1 und unabhängig von CCR9/CCL25 vermittelt [188].

Hinsichtlich ihrer Herkunft könnten zirkulierende  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup> Plasmablasten in der immunologischen Ruhephase aus der darm-assoziierten Mukosa und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin<sup>-</sup> Plasmablasten aus Immunreaktionen in den atemwegsassoziierten Immungeweben stammen [263, 320].

Zusammengefasst weisen Plasmablasten, die in der Ruhephase generiert werden, eine vollkommen andere Ausrüstung mit Chemokinrezeptoren und Zelladhäsionsmolekülen auf als tetanusspezifische Plasmablasten. Dies ermöglicht die gewebsspezifische Separation von Plasmablasten in systemischen versus mukosalen Plasmazelldepots (Knochenmark versus Lamina propria, Abb. 43).

### 5.3.2 Die Produktion der Plasmablasten im immunologischen Gleichgewicht ist unabhängig von der Milz

Die Abhängigkeit der Produktion von IgA<sup>+</sup> Plasmablasten im immunologischen Gleichgewicht von mukosalen Immunreaktionen wird durch viele Indizien unterstützt, ist jedoch nicht *in vivo* belegt. Ein komplementärer Ansatz beweist jedoch die Unabhängigkeit der Produktion solcher Plasmablasten von der Milz. Bei Splenektomierten wurden izIgA<sup>+</sup> Lymphozyten mit simultaner Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin in regulärer Frequenz im Blut nachgewiesen, sodass die Milz nicht die Quelle dieser Zellen ist und die Vorläufer der zirkulierenden IgA<sup>+</sup> Plasmablasten nicht von anderen löslichen oder zellulären Faktoren der Milz abhängig sind, wie analog bei Mäusen belegt wurde [321]. Demgegenüber benötigen zirkulierende CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen und polyreaktive B-Zell-Populationen die Milz oder Signale der Milz für ihre Aufrechterhaltung [243, 322, 323]. Folglich treten bei splenektomierten Patienten systemische bakterielle Infektionen gehäuft auf [324].

### 5.3.3 Induktion mukosaler Plasmablasten als Antwort auf symbiotische Bakterien

Symbiotische Bakterien könnten als Auslöser der zugrunde liegenden Immunreaktionen infrage kommen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme weisen zirkulierende Plasmablasten bei Gesunden wie auch bei RA-Patienten unter B-Zell-Depletion

- i) die Expression von IgA auf [316],
- ii) exprimieren einen mukosalen Migrationsphänotyp (wie in 5.3.1 diskutiert) und
- iii) sezernieren Bakterien-bindende Antikörper.

Dementsprechend sind solche IgA<sup>+</sup> Plasmablasten bei Gesunden (mit regelrechter Darmflora) jederzeit nachweisbar (5.2) und sezernieren sekretorisches IgA [161]. Die Produktion sekretorischer IgA-Antikörper als Antwort auf symbiotische Darmbakterien wurde bereits früher erwogen [316, 325, 326]. Bei solchen Immunantworten können sowohl spezielle dendritische Zellen als auch Epithelzellen eine Vermittlerrolle spielen. Sie können durch Bakterien aktiviert werden und lösen

daraufhin die Differenzierung von IgA<sup>+</sup> Plasmablasten durch beispielsweise APRIL bzw. direkte Antigenpräsentation durch dendritische Zellen aus [16, 300, 303-305, 327, 328].

Insgesamt ist es wahrscheinlich, dass die bei Gesunden und bei RA-Patienten unter B-Zell-Depletion im Blut zirkulierenden IgA<sup>+</sup> Plasmablasten im Rahmen bakteriell induzierter Immunreaktionen generiert wurden und eine protektive Funktion ausüben. So weisen beispielsweise RA-Patienten unter Rituximab-Therapie eine niedrige Inzidenz mukosaler Infektionen auf [94-97]. In einer Arbeit aus dem Jahr 1973 wurde die Halbwertszeit der im immunologischen Gleichgewicht generierten Plasmazellen des Dünndarmgewebes der Maus mit weniger als 5 Tagen bestimmt [329]. Aufgrund dessen ist ein Beitrag langlebiger mukosaler Plasmazellen zur Produktion Bakterien-bindender sekretorischer IgA-Antikörper unwahrscheinlich, wobei offen bleibt, ob nicht im Rahmen pathogenspezifischer mukosaler Immunantworten auch langlebige IgA<sup>+</sup> Plasmazellen gebildet werden können [155].

Die Mechanismen der durch sekretorisches IgA vermittelten Immunprotektion sind verschwommen. So wurde sowohl die vor allem sterisch verhinderte [330] als auch die begünstigte [331] Penetration IgA-gebundener Bakterien in das Darmgewebe beschrieben. Ferner beeinflusst das luminale IgA die Zusammensetzung der Darmflora [330, 332, 333] und spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung einer bestimmten symbiotischen Bakterienzusammensetzung in der Nähe der luminalen Epithelmembran, sodass pathogenen Erregern die Etablierung in dieser Mikroumgebung erschwert wird [330].

#### 5.3.4 Unabhängige Regulation mukosaler und systemischer Immunantworten auf der Ebene zirkulierender Plasmablasten

Eine sekundäre Tetanusimmunisierung bewirkt das transiente Auftreten einer großen Anzahl (antigenspezifischer) IgG<sup>+</sup> Plasmablasten und die Mobilisierung reifer IgG<sup>+</sup> Plasmazellen in das Blut. Zu diesem Zeitpunkt war keine signifikante Veränderung der Anzahl zirkulierender IgA<sup>+</sup> Plasmablasten und Plasmazellen bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Expression von CCR10 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin nachweisbar. Daraus folgt, dass die systemische Immunaktivierung keinen Einfluss auf Immunreaktionen hat, die im immunologischen Gleichgewicht ablaufen,

zumindest nicht auf ihr Potential, Plasmablasten hervorzubringen. Somit erfolgt die Regulation mukosaler und systemischer Immunreaktionen auf der Ebene zirkulierender Plasmablasten unabhängig voneinander. Plasmablasten aus verschiedenen Immunreaktionen können simultan im Blut auftreten und separieren sich ggf. durch gewebspezifische Zellmigration [143] (Abb. 43). Nach erfolgter Migration in die Plasmazelldepots ermöglicht die Trennung der systemischen und mukosalen Plasmazelldepots eine differentielle Homöostase von systemisch induzierten gegenüber mukosal induzierten Plasmazellen.

### 5.3.5 Im immunologischen Gleichgewicht generierte Plasmablasten interferieren nicht mit den Plasmazellen des humoralen Gedächtnisses

Es ist aus mehreren Gründen unwahrscheinlich, dass die im immunologischen Gleichgewicht generierten Plasmablasten zu dem von knochenmarkständigen Plasmazellen vermittelten humoralen Gedächtnis beitragen bzw. dass die zirkulierenden Plasmazellen von ihnen abstammen:

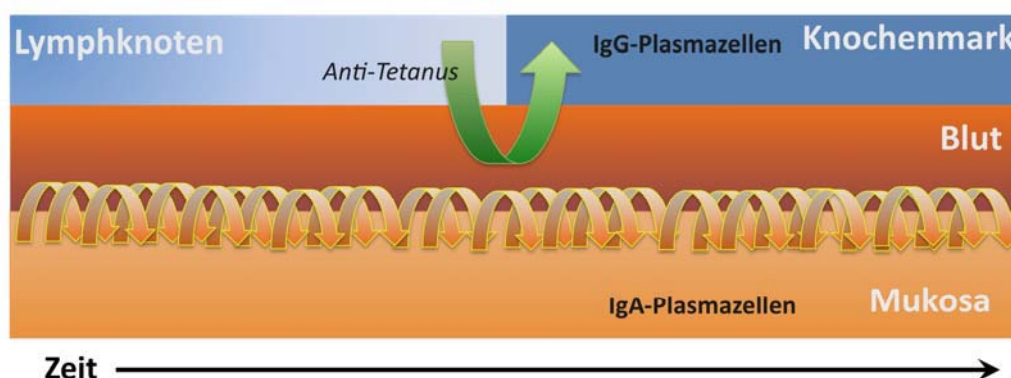
- i) Plasmazellen im Knochenmark produzieren seltener IgA als IgG, anders als Plasmablasten im peripheren Blut zur selben Zeit. Die kontinuierliche und nicht selektive Einwanderung der in der Ruhephase generierten „mukosalen“ Plasmablasten in das Knochenmark würde darin resultieren, dass 80 % der Plasmazellen im Knochenmark IgA exprimierten. Dies wurde jedoch nicht beobachtet, hingegen exprimierten nur 40 % der Knochenmarksplasmazellen IgA.
- ii) Knochenmarksplasmazellen sezernieren IgA-Monomere, zirkulierende antikörpersezernierende Zellen im immunologischen Gleichgewicht jedoch polymeres IgA [161].
- iii) Die in der Ruhephase generierten IgA<sup>+</sup> Plasmablasten exprimieren Rezeptoren für die Immigration in und die Migration innerhalb mukosaler Gewebe. Dadurch verringert sich die Wahrscheinlichkeit ihrer Immigration in das Knochenmark, selbst wenn sie prinzipiell die Fähigkeit hierzu besitzen würden.
- iv) In der Ruhephase konnte keine Mobilisierung von reifen IgG<sup>+</sup> Plasmazellen aus dem Gewebe in das Blut nachvollzogen werden, wie sie nach einer systemischen Tetanusimmunisierung beobachtet wurde. Während der Ruhephase zirkulierten



durchschnittlich  $5,75 \times 10^5$  IgG<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen im gesamten Blutvolumen (Anhang, Rechnung 1). Dabei handelt es sich in aller Wahrscheinlichkeit nicht um langlebige Plasmazellen des Knochenmarks, denn die Halbwertszeit des humoralen Gedächtnisses betrüge dann weniger als 1 Jahr, was *in vivo* nicht der Fall ist [114]: Diese Halbwertszeit variierte je nach Antigenspezifität, betrug jedoch immer  $> 11$  Jahre [114].

Daraus kann geschlossen werden, dass die chronische Produktion mukosaler Plasmablasten in der Ruhephase keinen substantiellen Einfluss auf die Plasmazellen des humoralen Gedächtnisses hat (Abb. 43).

Da das Knochenmark Sitz langlebiger Plasmazellen ist [6, 120], mukosale, zumindest im Dünndarm ansässige Plasmazellen jedoch eine nur kurze Halbwertszeit von einigen Tagen aufweisen [329], könnte gewebsspezifisches Migrationsverhalten von Plasmablasten zur differentiellen Ausprägung humoralen Gedächtnisses beitragen. Ausgehend von den Resultaten dieser Arbeit könnte die Blockade von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren für die Modulation der differentiellen Ausprägung des humoralen Gedächtnisses in Betracht gezogen werden. Beispielsweise könnten die Wechselwirkungen der Achsen CXCR4/CXCL12, CXCR3/CXCL9-11, CCR10/CCL28 bzw.  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin/MadCAM-1 gezielt inhibiert werden. Entsprechende Wirkstoffe, zum Beispiel der  $\alpha_4$ -Integrin-Antagonist Natalizumab oder der CXCR4-Antagonist AMD3100, befinden sich in anderen medizinischen Kontexten in der Erforschung bzw. klinischen Erprobung [334-337].



**Abb. 43. Unabhängige Regulation von IgA- und IgG-Plasmazellantworten durch gewebsspezifisches Migrationsverhalten**

### 5.3.6 Simultane Zirkulation mukosaler Plasmablasten und Plasmazellen im immunologischen Gleichgewichtszustand

In der immunologischen Ruhephase zirkulieren hauptsächlich IgA-sezernierende Zellen, die sich aus proliferierenden HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten und nicht-proliferierenden HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen zusammensetzen. Dies suggeriert die Mobilisierung mukosaler IgA<sup>+</sup> Plasmazellen in Abhängigkeit von den zirkulierenden mukosalen Plasmablasten in Analogie zur oben diskutierten Mobilisierung systemischer IgG<sup>+</sup> Plasmazellen nach einer Tetanusimmunisierung. In Übereinstimmung mit dieser Annahme werden durch die konditionelle Depletion peripherer CD20<sup>+</sup> B-Zellen sowohl Plasmablasten als auch Plasmazellen im Blut in vergleichbarem Ausmaß reduziert. Dies ist kompatibel mit der Annahme, dass die verminderte Anzahl migratorischer Plasmablasten die verminderte Anzahl mobilisierter Plasmazellen im Blut nach sich zieht.

Der Plasmablastenproduktion im Gleichgewichtszustand und unter B-Zell-Depletion lagen unbekannte Antigene zugrunde, weshalb die Antigenspezifität individueller Zellen hier nicht untersucht werden konnte. Eine in Zukunft geplante Analyse soll jedoch über die Antigenspezifität mukosaler Plasmablasten und Plasmazellen und den spezifischen Phänotyp von antigenspezifischen IgA<sup>+</sup> Plasmablasten im Rahmen einer oral induzierten Immunantwort Aufschluss geben (Kapitel 6). Ob der mukosale Plasmazellpool ähnlich wie der systemische stabil ist und auf die gleiche Weise oder völlig anders reguliert wird, ist bislang unklar [155] und wurde bisher nicht ausdrücklich thematisiert.

Insgesamt stützen die hier beschriebenen Beobachtungen die Hypothese der homöostatischen Dynamik der Anzahl zirkulierender Plasmablasten und gleichzeitig zirkulierenden Plasmazellen.

## **5.4 IgA-sezernierende Plasmazellen im menschlichen Knochenmark**

Etwa 40 % der Knochenmarksplasmazellen exprimieren IgA oder CCR10 als Kennzeichen mukosaler Immunantworten, obwohl das Knochenmark das bevorzugte Immigrationsgewebe für parenteral induzierte Plasmablasten darstellt [120, 128, 143].

Im immunologischen Ruhezustand zirkulieren kontinuierlich IgA<sup>+</sup>/CCR10<sup>+</sup> Plasmablasten, welche außerdem CXCR4 exprimieren und *in vitro* von CXCL12 attrahiert werden, was ihnen prinzipiell die Migration in das Knochenmark ermöglichen könnte.

Es ist weiterhin jedoch aus den bereits zuvor diskutierten Gründen unwahrscheinlich, dass im Ruhezustand generierte Plasmablasten zu dieser Population beitragen (5.3.5). Warum diese Plasmablasten funktionell CXCR4 exprimieren, aber offensichtlich keine Immigration in das Knochenmark stattfindet, bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Die Wechselwirkung von CXCL12 mit CXCR4 ist außer für systemisch induzierte Plasmazellen im Knochenmark (5.1.3) [200, 276] auch in das Migrationsverhalten IgA-sezernierender Zellen und somit in die Aufrechterhaltung mukosaler Immunglobulinproduktion involviert [189, 191, 197, 276]. Daher stellt die funktionelle Expression von CXCR4 auf Plasmablasten mit einem mukosalen Migrationsphänotyp im Ruhezustand keinen Widerspruch dar und ist vereinbar mit der Annahme, dass diese Plasmablasten in mukosale Gewebe einwandern. In den mukosalen Geweben könnte die Wechselwirkung CXCL12 [197] mit CXCR4 an der regelrechten Positionierung der Plasmazellen mitwirken [193].

IgA-sezernierende Zellen im Knochenmark sezernieren monomeres IgA [161], sodass die in dieser Arbeit nachgewiesenen IgA<sup>+</sup>/CCR10<sup>+</sup> Knochenmarksplasmazellen wahrscheinlich aus definierten, antigengetriebenen mukosalen Immunreaktionen stammen. Diese Sichtweise ist konsistent mit dem Nachweis einer signifikant erhöhten Anzahl zirkulierender antikörpersezernierender Zellen mit der Expression des mukosalen Adhäsionsmoleküls  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin bei 2 von 49 untersuchten gesunden Probanden. Ob diese Probanden später Krankheitssymptome zeigten, ist nicht bekannt, aber wahrscheinlich, da beispielsweise die Diarrhö mit einer erhöhten Frequenz zirkulierender antikörpersezernierender Zellen assoziiert ist [226, 240]. Somit reflektiert die drastisch erhöhte Frequenz zirkulierender mukosaler Plasmablasten wahrscheinlich eine mukosale Infektion [226]. Hierbei könnte ein Teil der im Rahmen solcher Immunantworten generierten Plasmablasten in das Knochenmark einwandern, um dort monomeres, „systemisches“ IgA zu sezernieren. In diesem Zusammenhang wurde *in vivo* die Migration antigenspezifischer IgA-sezernierender Zellen aus mukosalen Immunreaktionen in das Knochenmark bei rotavirusinfizierten

Mäusen nachgewiesen [311]. Die biologische Funktion systemischer IgA-Produktion wurde als „zweite Verteidigungslinie“ gegen invasive Pathogene postuliert [338] und könnte als *back-up* Strategie des Immunsystems dienen, wenn eine Infektion nicht hinreichend an den mukosalen Oberflächen kontrolliert wird und die Erreger in den systemischen Blutkreislauf übertreten. Monomeres IgA wird beim Menschen u. a. durch IgA-Rezeptoren (FcαRI, CD89) gebunden, welche von phagozytären Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden [339]. Mit aller Vorsicht könnte über die erfolgte oder nicht erfolgte T-Zell-Hilfe bei mukosalen Immunantworten als entscheidendes Ereignis für die mukosale Produktion später knochenmarkansässiger Plasmazellen spekuliert werden.

### **5.5 Autonome Produktion von Plasmablasten während konditioneller Depletion CD20-exprimierender B-Zellen mit Rituximab**

In diesem Teil der Arbeit wurden bei RA-Patienten vor und insbesondere während einer B-Zell-depletierenden Therapie mit Rituximab im Blut zirkulierende Plasmablasten und Plasmazellen nachgewiesen. Sie wurden auf ihre funktionellen Eigenschaften hin untersucht (5.5.2) und ihr Potential als Responseindikator getestet (5.5.1). Ihre eindeutige Detektion als antikörpersezernierende Zellen wurde

- i) anhand ihres Phänotyps (CD3<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup>/DAPI<sup>-</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup>) (3.5.3),
- ii) durch die spontane Sekretion von Antikörpern in Elispot-Experimenten und in *in vitro* Zellkulturexperimenten und
- iii) durch den Nachweis zytoplasmatischer Immunglobulinexpression [340] bestätigt (3.5.3).

Bereits vorher waren vergleichbare Zellen im Blut von B-Zell-depletierten Patienten mit RA [341] oder SLE [342] beschrieben worden, ohne dass deren Herkunft, Differenzierungsstadium oder Reaktivität untersucht wurde.

Die Interpretation der therapeutischen Depletion peripherer CD20<sup>+</sup> B-Zellen als konditionelle Unterbrechung bzw. Paralyse der B-Zell-Migration zwischen den Immunorganen ermöglicht es außerdem, spezifische Umstände der Differenzierung der mukosalen Plasmablasten zu betrachten (5.5.3).

### 5.5.1 Klinisches Ansprechen auf die Rituximab-Therapie

In Übereinstimmung mit früheren klinischen Studien [94-97] zeigten mindestens 64 % der RA-Patienten nach der B-Zell-Depletion eine moderate oder gute klinische Besserung gemäß EULAR-Kriterien.

Anders als in einer vorangegangenen Studie [343] wurde hier eine hohe Anzahl CD19<sup>+</sup> B-Zellen vor Therapiebeginn als statistisch signifikanter prädiktiver Indikator für schlechtes klinisches Therapieansprechen identifiziert. Das abweichende Ergebnis zu dieser Studie [343] könnte u. a. durch abweichende Patienteneinschlusskriterien bedingt sein. Unabhängig von der Anzahl der B-Zellen vor Therapiebeginn wurde jedoch nach Einleitung der Rituximab-Therapie bei allen Patienten die vollständige Depletion von CD20<sup>+</sup> B-Zellen aus dem Blut erreicht. Dennoch kann eine unterschiedlich erfolgreiche Depletion gewebständiger B-Zellen in Abhängigkeit von der B-Zell-Anzahl vor Therapiebeginn nicht ausgeschlossen werden. So wurde bei *Non-Respondern* die frühere Repopulation des Blutes mit CD20<sup>+</sup> B-Zellen beobachtet, was u. a. einer unvollständigen Depletion gewebständiger B-Zellen geschuldet sein könnte. Zusammengefasst könnte die hohe Anzahl zirkulierender B-Zellen bei Patienten vor Therapiebeginn als eine Indikation für eine optionale dritte Dosis Rituximab beim ersten Behandlungskurs gelten. Hinsichtlich der Anwendungssicherheit wäre dies vertretbar, da im Rahmen der Lymphomtherapie mit Rituximab bis zu 8 sukzessive Dosen injiziert werden [344].

In der vorliegenden Studie zeigen *Non-Responder* eine höhere Rheumafaktor (RF)-Aktivität im Blutserum. Dies weist darauf hin, dass individuell verschiedene Pathomechanismen der B-Zellen in die Pathogenese der RA involviert sind:

- i) Bei RF-positiven RA-Patienten spielen Autoantikörper und somit die diesen zugrunde liegenden CD20-negativen Plasmazellen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese [100], während andere Pathomechanismen der B-Zellen bei diesen Patienten anscheinend von untergeordneter Bedeutung sind. Insofern wurde ein Zusammenhang zwischen RF-Titer und Krankheitsaktivität bei der RA nachgewiesen [100].

Bei diesen RF-positiven Patienten bewirkt die B-Zell-Depletion die Reduktion der RF-Titer im Blutserum, nicht aber deren Auslöschung [100]. Bereits oben

diskutierten Aspekten der Plasmazellhomöostase folgend (5.1), wäre die Reduktion durch die unterbundene Generierung neuer RF-sezernierender Plasmablasten und das Absterben kurzlebiger RF-sezernierender Plasmazellen erklärbar. Währenddessen würde der stabile Anteil der RF-Titer von langlebigen Plasmazellen getragen, die, anders als Plasmablasten, nicht von der Präsenz aktivierbarer B-Zellen abhängen [120, 124] und durch Rituximab nicht oder nur marginal in ihrer Anzahl beeinflusst werden [102, 345], da sie kein CD20 exprimieren. Autoreaktive Plasmazellen können langlebig sein [78, 122, 346] und könnten daher auch während der B-Zell-Depletion fortwährend RF sezernieren [100]. Selbiges gilt auch für die Produktion bzw. unvollständige Beseitigung anderer Autoantikörper, wie zum Beispiel solcher, die gegen zyklische citrullinierte Peptide (Anti-CCP) gerichtet sind [100, 347].

- ii) Die Pathogenese der RA bei RF-negativen RA-Patienten beruht nicht auf der Bildung von Autoantikörpern durch autoreaktiven Plasmazellen, sondern muss durch andere B-Zell-Funktionen, wie Antigenpräsentation und Zytokinsekretion zustande kommen. Die genauen pathogenen Mechanismen der B-Zellen sind hierbei unklar, ihre Existenz wird jedoch durch die klinische Wirksamkeit der B-Zell-Depletion angezeigt.

Infolge der Rituximab-Behandlung werden praktisch alle CD20<sup>+</sup> B-Zellen des peripheren Blutes depletiert. Die der Depletion zugrunde liegenden Mechanismen umfassen vor allem die antikörper- aber auch die komplementabhängige zellvermittelte Zytotoxizität und die Induktion von Apoptose [106, 107]. Gleichzeitig sank die Anzahl der Plasmablasten und Plasmazellen um 75 %, sodass etwa 25 % im Blut nachweisbar blieben (5.5.3). Dabei wurde sichergestellt, dass zirkulierende Plasmablasten und Plasmazellen auf mRNA- und Proteinebene kein CD20 exprimieren (Wondossen, Mei, Yoshida, et al., unveröffentlicht), sodass deren Reduktion nicht auf die direkte Einwirkung von Rituximab via CD20 auf selbige zurückzuführen ist.

Die Anzahl der Plasmablasten und Plasmazellen im Blut war, abgesehen von dem Zeitpunkt 6 Monate nach Therapiebeginn weder vor der noch zu verschiedenen Zeitpunkten während der B-Zell-Depletion mit der Krankheitsaktivität assoziiert. Zu diesem speziellen Zeitpunkt indiziert eine höhere Anzahl CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup>/CD38<sup>stark</sup>/CD27<sup>stark</sup> Zellen auch ein schlechteres

Therapieansprechen [341]. Ursache hierfür könnte die Regeneration der für die Plasmablastenproduktion notwendigen mikroanatomischen Strukturen in den sekundären lymphatischen Geweben und die beginnende Aufhebung der B-Zell-Migrationsparalyse sein, wie durch die Repopulation des Blutes mit B-Zellen bei einigen Patienten zu diesem Zeitpunkt belegt wird. Warum diese Assoziation bei späteren Zeitpunkten < 6 Monate nach Therapiebeginn nicht mehr vorliegt, kann nicht abschließend geklärt werden, wobei ein Effekt durch den Wegfall einzelner Messpunkte aufgrund der Einleitung eines zweiten Behandlungszyklus bei einigen Patienten nicht ausgeschlossen werden kann.

Generell wurden im Verlauf der B-Zell-Depletion variable Unterschiede bezüglich der Anzahl zirkulierender Plasmablasten und Plasmazellen zwischen *Respondern* und *Non-Respondern* festgestellt, sodass dieser Parameter nicht als genereller Indikator für das Therapieansprechen oder die Erkrankungsaktivität herangezogen werden kann. Überdies wurde die spontane Produktion von RF (IgA-RF) durch unter B-Zell-Depletion zirkulierende Plasmablasten und Plasmazellen bei nur 5 % der untersuchten Proben nachgewiesen, gegenüber dem Nachweis bakterieller Reaktivität bei 100 % und von Polyreaktivität bei > 90 % der Proben. Damit stellen die zirkulierenden Plasmablasten und Plasmazellen bei RA-Patienten insbesondere unter B-Zell-Depletion kein zelluläres Korrelat persistierender Autoantikörperproduktion dar.

Insgesamt bestätigt die klinische Wirksamkeit der Rituximab-Therapie bei RA-Patienten die wichtige Rolle von B-Zellen bei der Pathogenese der RA und stellt frühere Ansichten, nach denen die RA immunologisch im Wesentlichen von T-Zellen getragen wird [105], infrage.

### 5.5.2 Zirkulierende Plasmablasten belegen die Persistenz

#### Rituximab-refraktärer B-Zellen

Trotz der umfassenden B-Zell-Depletion im peripheren Blut können ständig CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Zellen nachgewiesen werden. Dabei stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um Plasmablasten, Plasmazellen oder eine Mischung beider handelt.

Mindestens die Hälfte der unter B-Zell-Depletion zirkulierenden

CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>stark</sup>/CD20<sup>-</sup> Zellen entsprechen phänotypisch und funktionell Plasmablasten, da sie als migratorische, proliferierende, HLA-DR<sup>stark</sup> antikörpersezernierende Zellen charakterisiert wurden. Die übrigen entsprechen phänotypisch Plasmazellen.

Lediglich 6 - 8 Tage nach einer parenteralen bzw. 5 - 16 Tage nach einer oralen Immunaktivierung zirkulieren antigenspezifische Plasmablasten im Blut, nicht jedoch davor oder danach [154, 233, 263]. Dadurch kann das Alter der hier beobachteten Plasmablasten auf maximal 2 Wochen bestimmt werden. So spiegelt die über Monate fortdauernde Zirkulation von Plasmablasten die Persistenz funktioneller gewebständiger B-Zellen infolge der B-Zell-depletierenden Therapie mit Rituximab wider. Die vollständige Depletion aller B-Zellen würde das Versiegen der Plasmablastenproduktion bedeuten, und deren Anzahl im Blut würde im zeitlichen Verlauf der B-Zell-Depletion abnehmen, was jedoch nicht beobachtet wurde. Folglich werden im Rahmen einer Rituximab-Therapie nicht alle B-Zellen aus dem Organismus entfernt. Insbesondere scheinen bestimmte B-Zellen in mukosalen Immungewebe spezifisch vor ihrer Depletion geschützt zu sein, da

- i) die ihnen entspringenden Plasmablasten IgA mit bakterieller Reaktivität sezernieren und durch die Expression von IgA, CCR10 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin einen mukosalen Migrationsphänotyp aufweisen (wie diskutiert, 5.3.1),
- ii) bei mukosaler bzw. peritonealen B-Zellen in Mausmodellen der B-Zell-Depletion ein gewisser Schutz vor deren Depletion nachgewiesen wurde (s. u.) und
- iii) die wiederholte Behandlung mit Rituximab nicht zu einer weiteren Reduktion der Plasmablastenproduktion führte.

Somit kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass die Persistenz dieser vermutlich mukosalen B-Zellen auf eine zu geringe Dosis Rituximab zurückzuführen ist. In diesem Falle sollte die Plasmablastenproduktion nach einem zweiten Behandlungskurs gestoppt bzw. erneut signifikant reduziert werden, was nicht beobachtet wurde. Dahingehend wurden bei mit Rituximab behandelten Makaken, unabhängig von der Dosis des Medikaments, ebenfalls nicht alle B-Zellen depletiert [348, 349].

Insgesamt scheint die B-Zell-Population, die der Produktion mukosaler Plasmablasten in Abwesenheit zirkulierender CD20<sup>+</sup> B-Zellen zugrunde liegt,



spezifisch durch extrinsische Faktoren, vermutlich ihrer Gewebeumgebung [350], vor ihrer Depletion durch Rituximab geschützt zu sein.

In drei Mausmodellen der therapeutischen B-Zell-Depletion wurden systematisch die Effizienz und der Mechanismus der Depletion untersucht [350-352]. Bei zwei dieser Studien wurden murine Anti-CD20-Antikörper verwendet. In diesen Studien wurden vor allem Zellen der B1-Linie und der B2-Linie im Peritoneum als therapierefraktär beschrieben [350, 352]. Es wurde aber auch die unvollständige Depletion von transitionellen (T1) B-Zellen [352] und von CD5<sup>+</sup> B1a-Zellen in der Milz [350] beobachtet. Dabei war die Resistenz gegenüber der B-Zell-Depletion keine intrinsische Eigenschaft der verbleibenden B-Zellen, sondern durch deren peritoneale Lokalisation bedingt [350]. Bei mit einer Einzeldosis Rituximab behandelten transgenen Mäusen, deren B-Zellen humanes CD20 exprimieren, werden peritoneale B-Zellen verzögert, aber effizient depletiert. Hingegen sind hier speziell B-Zellen der Keimzentren in der Milz und den Peyer'schen Plaques resistent gegen B-Zell-Depletion [351]. Allerdings wurde die Wirkung einer zweiten Dosis Rituximab auf die dann vermutlich weiter differenzierten B-Zellen der Keimzentren nicht untersucht.

Beim Menschen erfolgt die Depletion CD20-exprimierender B-Zellen in systemischen Immungeweben wie z. B. der Milz [342, 353, 354], Lymphknoten [353], Tonsillen [355] und Knochenmark [101, 102, 342] nahezu vollständig. Dementsprechend wird die Generierung von Plasmablasten bzw. spezifischer Antikörpern im Rahmen systemischer Impfreaktionen weitgehend unterbunden [356, 357]. Die B-Zell-Depletion in humanen mukosalen Immungeweben wurde bisher nicht systematisch untersucht; die Abwesenheit CD20-exprimierender Zellen nach Rituximab-Therapie wurde lediglich in einem einzelnen Fall im Appendix belegt [358].

Zusammengefasst ist es wahrscheinlich, dass die unter B-Zell-Depletion zirkulierenden IgA<sup>+</sup> Plasmablasten im Rahmen bakteriell induzierter mukosaler Immunreaktionen generiert wurden und eine protektive Funktion ausüben können. Die genaue örtliche Umgebung ihrer Differenzierung kann nicht eindeutig bestimmt werden. Denkbar ist jedoch, dass ihre Vorläufer mukosale Gedächtnis-B-Zellen sind (5.5.3).

### 5.5.3 Autonome Produktion mukosaler Plasmablasten unter B-Zell-Depletion

Durch die B-Zell-Depletion mit Rituximab wurde der Austausch CD20-exprimierender B-Zellen zwischen den Immungeweben über das Blut *in vivo* mindestens 6 und höchstens 21 Monate lang unterbrochen. Nach der Depletion der B-Zellen wurde die Anzahl zirkulierender Plasmablasten um durchschnittlich höchstens 75 % reduziert, woraus sich ergibt, dass maximal 75 % in Abhängigkeit von zirkulierenden B-Zellen generiert wurden. Mindestens 25 % der mukosalen Plasmablasten im immunologischen Gleichgewicht (von RA-Patienten) wurden somit unter Bedingungen generiert, unter denen weder zirkulierende naive noch antigenerfahrene B-Zellen aus anderen lymphatischen Geweben zur mukosalen Plasmablastenproduktion beitragen konnten. Dies bedeutet einen Ausstoß von  $\geq 5,3 \times 10^8$  Plasmablasten über einen Zeitraum von 18 Monaten unter durchgehender B-Zell-Depletion (Anhang, Rechnung 2). Damit findet die Produktion einer signifikanten Menge mukosaler Plasmablasten (Anhang, Rechnung 2) auf autonome Weise statt. Dies wiederum reflektiert die Fähigkeit des menschlichen Mukosagewebes, autonome Antikörperantworten zu realisieren.

Die Hypothese, dass der unter B-Zell-Depletion anhaltenden Produktion von IgA<sup>+</sup> Plasmablasten spezielle mukosale Gedächtnis-B-Zellen zugrunde liegen, basiert auf den folgenden Beobachtungen:

- i) Die Differenzierung solcher IgA<sup>+</sup> Plasmablasten vollzieht sich langfristig unabhängig von der Präsenz von naiven und Gedächtnis-B-Zellen im peripheren Blut, sodass diese nicht als Vorläufer dieser IgA<sup>+</sup> Plasmablasten infrage kommen. Die Vorläufer sind daher entweder langlebige oder sich selbst regenerierende B-Zellen.
- ii) Ihre Produktion erfolgt unabhängig von den B-Zellen und anderen Faktoren der Milz, denn bei bei Splenektomierten findet sie uneingeschränkt statt. Die Analogie zum murinen Immunsystem vorausgesetzt, belegt diese Beobachtung weiterhin die Unabhängigkeit ihrer Produktion von peritonealen B1(a)-Zellen [11, 14, 359], die ihrerseits von der Anwesenheit der Milz abhängig sind [322].

- iii) Die Vorläufer dieser autonom generierten Plasmablasten waren im Blut unter B-Zell-Depletion, auch nach dem nahezu vollständigen Abbau von Rituximab *in vivo* [343], nicht als CD20-exprimierende Zellen nachweisbar und sind daher nicht-rezirkulierende B-Zellen, die vermutlich in mukosalen Geweben residieren. Dahingehend unterscheiden sie sich von parenteral induzierten Gedächtnis-B-Zellen, wie den in der vorliegenden Arbeit im Blut beobachteten tetanusspezifischen Gedächtnis-B-Zellen nach einer sekundären Tetanusimmunisierung. Während die Funktion solcher parenteral induzierter Gedächtnis-B-Zellen - das Aufspüren von Pathogenen im Blutkreislauf und in den systemischen Immungewebe - mit ihrer Rezirkulation verknüpft ist, könnte die Bestimmung mukosaler Gedächtnis-B-Zellen im Aufspüren von Pathogenen liegen, die die mukosalen Oberflächen penetrieren. Gemäß dieser Funktion wäre ihre Lokalisation im Darmgewebe nahe der epithelialen Oberflächen [360-362], nicht aber in der Milz oder im Blut von Vorteil. Tatsächlich wurde anhand Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen gezeigt, dass mukosale (hier oral) induzierte Gedächtnis-B-Zellen nicht gleichmäßig über die Immungewebe verteilt vorliegen. Stattdessen konzentrieren sie sich in den mukosalen Geweben, beispielsweise den Tonsillen, und sind nur in weitaus niedrigerer Frequenz in der Milz und im Blut nachweisbar sind [363].
- iv) Die molekulare Analyse der V<sub>H</sub>-Gen-Rearrangements von zirkulierenden IgA<sup>+</sup> Plasmablasten bei Gesunden ergab, dass alle diese Zellen, als Indiz für ihre Produktion im Rahmen einer Gedächtnisantwort [229, 364], Mutationen in ihren CDR3-Region aufweisen. Dabei lag die durchschnittliche Mutationsfrequenz (8,5 %) bei 88 % derjenigen von tetanusspezifischen Gedächtnis-B-Zellen (9,7 %, unveröffentlichte Daten; Frölich, Giesecke, Mei, Dörner et al.).
- v) Für die Rituximab-Resistenz bestimmter Gedächtnis-B-Zellen spricht ferner, dass in der humanen Milz einige parenteral induzierte Gedächtnis-B-Zellen, jedoch keine naiven B-Zellen eine Rituximab-Behandlung überleben können [354].

Insgesamt weisen die vorliegenden Ergebnisse auf die Existenz einer sesshaften mukosalen Gedächtnis-B-Zell-Population bei Menschen hin, die signifikant zum mukosalen humoralen Gedächtnis beitragen könnte und

- nicht rezirkuliert
- im Rahmen chronischer Immunantworten auf Bakterien aktiviert werden kann
- unabhängig von der Milz ist und
- nicht (vollständig) durch Rituximab depletiert wird.

Unklar ist, ob solche Gedächtnis-B-Zellen tatsächlich spezifisch im Rahmen bakteriell getriebener Immunantworten entstanden sind oder ob es sich um Gedächtnis-B-Zellen mit anderer Spezifität handelt, die möglicherweise kontinuierlich und unspezifisch durch Zytokine aktiviert werden. Ein denkbarer Aufenthaltsort für diese Zellen sind die sogenannten *milky spots* des Omentums. Sie repräsentieren funktionelle Immungewebe, in denen B-Zellen durch penetrative Antigene oder Zytokine aktiviert und unabhängig von anderen Immungeweben sowie durch ihre Lokalisation dieser Gewebe in der Peritonealhöhle vor Rituximab geschützt [350] zu Plasmazellen differenzieren können [150].

## 6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit vermitteln einen Einblick in die differentielle Homöostase mukosal induzierter gegenüber parenteral induzierter Plasmazellen und ihrer Vorläufer, der Plasmablasten, als Antikörperproduzenten des Immunsystems. Die Regulation der Immunantworten beiden Typs scheint auf Ebene der Plasmablasten weitgehend unabhängig voneinander zu erfolgen. Das gewebspezifische Migrationsverhalten zirkulierender Plasmablasten ermöglicht die räumliche Separierung der jeweiligen Plasmazellen und somit eine separate biologische Regulation der in der Lamina propria lagernden mukosalen bzw. der im Knochenmark lagernden parenteral induzierten Plasmazellen.

Die parenterale Plasmazellhomöostase wurde hier im Rahmen einer gedächtnisinduzierenden sekundären Immunantwort anhand antigenspezifischer Plasmablasten untersucht. Hierfür wurde eigens ein Verfahren zur durchflusszytometrischen Detektion tetanusspezifischer B-Zellen und Plasmablasten etabliert und validiert. Als Schlüsselbeobachtung wurden im Blut Tetanusimmunisierter 7 Tage nach der Immunisierung antigenspezifische Plasmablasten neben einer bis dahin nicht beschriebenen Population von Plasmazellen reifen Phänotyps nachgewiesen. Darauf aufbauend wird die Hypothese der Mobilisierung reifer Plasmazellen des Knochenmarks durch neu generierte Plasmablasten im Rahmen parenteraler Immunantworten als Anpassungsmechanismus des humoralen Gedächtnisses formuliert. Diesem Konzept folgend, kann in Abhängigkeit der individuellen antigenischen Umwelt eine neue Antigenpezifität auf Kosten eines jeweils minimalen Bruchteils aller anderen bereits vorher im Gedächtnis etablierten Spezifitäten in das Gedächtnis aufgenommen werden. Weiterhin wird postuliert, dass ein solcher Anpassungszyklus nur im Rahmen systemischer Immunreaktionen, also im Rahmen von Impfungen und schweren Infektionen, erfolgen kann. Dieses Modell ist kompatibel mit der Auffassung, dass das humorale Gedächtnis durch die Lebensspanne von Plasmazellen aufrechterhalten und reguliert wird. In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass im immunologischen Gleichgewicht (sowie während der therapeutischen B-Zell-Depletion bei Rheumapatienten) im Wesentlichen Plasmablasten im Rahmen chronischer, mukosaler, vermutlich bakteriell getriebener

Immunantworten generiert werden. Plasmablasten aus solchen mukosalen Immunantworten besitzen nicht die Kompetenz, reife Plasmazellen des humoralen Gedächtnisses aus dem Knochenmark zu mobilisieren. Vielmehr wurden Anhaltspunkte dafür gefunden, dass analog zur Mobilisierung von Knochenmarksplasmazellen durch parenteral induzierte Plasmablasten auch die Mobilisierung reifer mukosaler Plasmazellen durch neu generierte mukosale Plasmablasten stattfindet. Insofern soll in einem Anschlussprojekt die Homöostase mukosaler Plasmablasten und Plasmazellen anhand einer oralen Choleraimmunisierung analysiert werden. Dabei gilt es u. a. herauszufinden, wie das mukosale Plasmazellkompartiment und die Stabilität protektiver sekretorischer Antikörperspiegel zustande kommen und reguliert werden. Einen ersten Hinweis hat der Nachweis mukosaler Plasmablasten mit bakterieller Reaktivität während der Unterbrechung der Zirkulation (und weitgehenden Depletion) von peripheren B-Zellen bei Rheumapatienten und bei Patienten nach Milzentnahme erbracht. Der Nachweis dieser Zellen belegt deren autonome Differenzierung in mukosalen Geweben, wobei sesshafte Gedächtnis-B-Zellen deren wahrscheinliche Vorläufer sind. Sowohl der Differenzierungsprozess mukosaler Plasmablasten als auch die Mikroumgebung reifer mukosaler Plasmazellen, zum Beispiel in der Lamina propria, sollen ebenfalls in einem zukünftigen Projekt thematisiert werden. Im Vergleich zu diesen sollen Plasmazellen des humanen Knochenmarks eingehender analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde belegt, dass Knochenmarksplasmazellen eine heterogene Zellpopulation sind und zukünftig soll untersucht werden, inwiefern die Verschiedenheit bestimmter Plasmazellsubpopulationen mit der beschriebenen differentiellen Fähigkeit zur Ausprägung humoralen Gedächtnisses bestimmter Antigenspezifitäten einhergeht.

Hinsichtlich der klinischen Relevanz der in der B-Zell-Depletionsphase zirkulierenden Plasmablasten und Plasmazellen für die Aktivität der rheumatoiden Arthritis und das Therapieansprechen wurden kontroverse Beobachtungen gemacht. Einerseits wurden Anzeichen ihrer Produktion im Rahmen homöostatischer mukosaler Immunreaktionen und damit einhergehend die sehr seltene Produktion des IgA-Rheumafaktors und die weitgehende statistische Unabhängigkeit ihrer Anzahl im Blut und dem Therapieansprechen bzw. der Krankheitsaktivität nachgewiesen. Andererseits wurde der Zusammenhang zwischen ihrer Anzahl und der Krankheitsaktivität zu genau einem der Repopulation des Blutes mit B-Zellen

vorausgehenden Zeitpunkt belegt. Daher empfiehlt sich die Untersuchung einer höheren Anzahl Rituximab-behandelter Rheumapatienten, die entsprechend der Qualität und Quantität der individuellen humoralen Krankheitsbeteiligung getrennt analysiert werden sollten. Weiterhin wird eine möglichst präzise Vorhersage der klinischen Wirksamkeit der B-Zell-Depletion angestrebt. Dazu ist vermutlich eine Kombination mehrerer Parameter notwendig, die (mindestens) die Anzahl und den Aktivierungsstatus von B-Zellen und ihrer Subpopulationen, die Art und Konzentration von Autoantikörpern im Serum, und die Auswirkung der B-Zell-Depletion auf das Zytokinmilieu im Blutserum einschließt. Dies soll experimentell getestet und geeignete Kandidatenparameter identifiziert werden.

Schließlich soll bei Patienten mit SLE der Beitrag parenteraler und mukosaler Immunreaktionen zur krankheitstypischen und pathogenetisch bedeutsamen Plasmablastenüberproduktion analysiert werden. Damit werden neue und tiefere Einblicke in die der (humoralen) Autoimmunität bei diesen Patienten zugrunde liegenden Immunreaktionen angestrebt.





## Referenzen

1. von Behring, E. and S. Kitasato, *Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren*. Dt. medizinische Wochenschrift, 1890. **16**: p. 1113-1114.
2. Mathers, C., T. Boerma, and D.M. Fat, *The global burden of disease: 2004 update*. 2004, WHO: Geneva.
3. Zinkernagel, R.M. and H. Hengartner, *Protective 'immunity' by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 310-9.
4. Schitteck, B. and K. Rajewsky, *Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors*. Nature, 1990. **346**(6286): p. 749-51.
5. Slifka, M.K., et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 363-72.
6. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch, *Lifetime of plasma cells in the bone marrow*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 133-134.
7. Burnet, M.F., *A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection*. Australien Journal of science, 1957. **20**(3): p. 67-69.
8. Talmage, D.W., *Allergy and immunology*. Annu Rev Med, 1957. **8**: p. 239-56.
9. Nossal, G.J., *One cell-one antibody: prelude and aftermath*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1015-7.
10. Qi, H., et al., *Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1672-6.
11. Kroese, F.G., et al., *Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity*. Int Immunol, 1989. **1**(1): p. 75-84.
12. Dorshkind, K. and E. Montecino-Rodriguez, *Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(3): p. 213-9.
13. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *B cell development pathways*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 595-621.
14. Kroese, F.G., W.A. Ammerlaan, and A.B. Kantor, *Evidence that intestinal IgA plasma cells in mu, kappa transgenic mice are derived from B-1 (Ly-1 B) cells*. Int Immunol, 1993. **5**(10): p. 1317-27.
15. Fagarasan, S., et al., *In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria*. Nature, 2001. **413**(6856): p. 639-43.
16. Cerutti, A. and M. Rescigno, *The biology of intestinal immunoglobulin A responses*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 740-50.
17. Harris, D.P., et al., *Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 475-82.
18. Heyman, B., *Feedback regulation by IgG antibodies*. Immunol Lett, 2003. **88**(2): p. 157-61.
19. Harte, P.G., A. Cooke, and J.H. Playfair, *Specific monoclonal IgM is a potent adjuvant in murine malaria vaccination*. Nature, 1983. **302**(5905): p. 256-8.
20. Radl, J., et al., *Immunoglobulin patterns in humans over 95 years of age*. Clin Exp Immunol, 1975. **22**(1): p. 84-90.
21. Dombrowicz, D. and M. Capron, *Eosinophils, allergy and parasites*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(6): p. 716-20.
22. Gould, H.J. and B.J. Sutton, *IgE in allergy and asthma today*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 205-17.
23. Vaerman, J.P., et al., *Antibody against the human J chain inhibits polymeric Ig receptor-mediated biliary and epithelial transport of human polymeric IgA*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 171-82.
24. Vaerman, J.P., et al., *Lack of SC/plgR-mediated epithelial transport of a human polymeric IgA*

- devoid of J chain: in vitro and in vivo studies.* Immunology, 1998. **95**(1): p. 90-6.
25. Johansen, F.E., R. Braathen, and P. Brandtzaeg, *The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA.* J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5185-92.
  26. Hendrickson, B.A., et al., *Altered hepatic transport of immunoglobulin A in mice lacking the J chain.* J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1905-11.
  27. Wienands, J. and N. Engels, *Multitasking of Ig-alpha and Ig-beta to regulate B cell antigen receptor function.* Int Rev Immunol, 2001. **20**(6): p. 679-96.
  28. Gauld, S.B., J.M. Dal Porto, and J.C. Cambier, *B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease.* Science, 2002. **296**(5573): p. 1641-2.
  29. Busslinger, M., *Transcriptional control of early B cell development.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 55-79.
  30. Jung, D., et al., *Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus.* Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 541-70.
  31. Schlissel, M.S., *The regulation of receptor editing.* Adv Exp Med Biol, 2007. **596**: p. 173-9.
  32. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.
  33. Ghia, P., et al., *B-cell development: a comparison between mouse and man.* Immunol Today, 1998. **19**(10): p. 480-5.
  34. Arpin, C., et al., *Generation of memory B cells and plasma cells in vitro.* Science, 1995. **268**(5211): p. 720-722.
  35. O'Connor, B.P., et al., *Imprinting the fate of antigen-reactive B cells through the affinity of the B cell receptor.* J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7723-32.
  36. MacLennan, I.C., *Germinal centers.* Annu. Rev. Immunol., 1994. **12**: p. 117-139.
  37. MacLennan, I.C., et al., *Extrafollicular antibody responses.* Immunol Rev, 2003. **194**: p. 8-18.
  38. Cobaleda, C., et al., *Pax5: the guardian of B cell identity and function.* Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 463-70.
  39. Delogu, A., et al., *Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells.* Immunity, 2006. **24**(3): p. 269-81.
  40. Turner, C.A., Jr., D.H. Mack, and M.M. Davis, *Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells.* Cell, 1994. **77**(2): p. 297-306.
  41. Shaffer, A.L., et al., *Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program.* Immunity, 2002. **17**(1): p. 51-62.
  42. Mock, B.A., et al., *The B-lymphocyte maturation promoting transcription factor BLIMP1/PRDI-BF1 maps to D6S447 on human chromosome 6q21-q22.1 and the syntenic region of mouse chromosome 10.* Genomics, 1996. **37**(1): p. 24-8.
  43. Yoshida, H., et al., *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor.* Cell, 2001. **107**(7): p. 881-91.
  44. Stockdale, A.M., et al., *The expression of membrane and secreted immunoglobulin during the in vitro differentiation of the murine B cell lymphoma CH12.* J Immunol, 1987. **139**(10): p. 3527-35.
  45. Shaffer, A.L., et al., *XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation.* Immunity, 2004. **21**(1): p. 81-93.
  46. Tunyaplin, C., et al., *Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation.* J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1158-65.
  47. Fearon, D.T., P. Manders, and S.D. Wagner, *Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination.* Science, 2001. **293**(5528): p. 248-50.
  48. Tourigny, M.R., et al., *CDK inhibitor p18(INK4c) is required for the generation of functional plasma cells.* Immunity, 2002. **17**(2): p. 179-89.

- 49.Reimold, A.M., et al., *Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 300-7.
- 50.Piskurich, J.F., et al., *BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 526-32.
- 51.Calame, K.L., K.I. Lin, and C. Tunyaplin, *Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 205-30.
- 52.Iwakoshi, N.N., et al., *Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 321-9.
- 53.Calfon, M., et al., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
- 54.Nagumo, H. and K. Agematsu, *Synergistic augmentative effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interactions on B-cell immunoglobulin synthesis*. Immunology, 1998. **94**(3): p. 388-394.
- 55.Kobata, T., et al., *CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1995. **92**(24): p. 11249-11253.
- 56.Bernasconi, N.L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia, *Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2199-202.
- 57.Stuber, E. and W. Strober, *The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 979-89.
- 58.Ettinger, R., et al., *IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 7867-79.
- 59.Agematsu, K., et al., *Plasma cell generation from B-lymphocytes via CD27/CD70 interaction*. Leuk Lymphoma, 1999. **35**(3-4): p. 219-25.
- 60.Huggins, J., et al., *CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27- naive human B cells*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1611-9.
- 61.Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 230-42.
- 62.Smith, K.G., et al., *The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci*. Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 444-8.
- 63.Benner, R., W. Hijmans, and J.J. Haaijman, *The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation*. Clin Exp Immunol, 1981. **46**(1): p. 1-8.
- 64.Weigert, M.G., et al., *Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody*. Nature, 1970. **228**(5276): p. 1045-7.
- 65.Berek, C., J.M. Jarvis, and C. Milstein, *Activation of memory and virgin B cell clones in hyperimmune animals*. Eur J Immunol, 1987. **17**(8): p. 1121-9.
- 66.Berek, C., A. Berger, and M. Apel, *Maturation of the immune response in germinal centers*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1121-9.
- 67.Siskind, G.W., P. Dunn, and J.G. Walker, *Studies on the control of antibody synthesis. II. Effect of antigen dose and of suppression by passive antibody on the affinity of antibody synthesized*. J Exp Med, 1968. **127**(1): p. 55-66.
- 68.Rajewsky, K., *Clonal selection and learning in the antibody system*. Nature, 1996. **381**(6585): p. 751-8.
- 69.Takahashi, Y., et al., *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 885-95.
- 70.Jacob, J., et al., *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells*. J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1293-307.
- 71.Jacob, J., R. Kassir, and G. Kelsoe, *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations*. J.Exp.Med.,

## Referenzen

---

1991. **173**(5): p. 1165-1175.
72. William, J., et al., *Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2066-70.
73. Matsumoto, M., et al., *Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6590): p. 462-6.
74. Stavnezer, J. and C.T. Amemiya, *Evolution of isotype switching*. Semin Immunol, 2004. **16**(4): p. 257-75.
75. Honjo, T., K. Kinoshita, and M. Muramatsu, *Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 165-96.
76. Snapper, C.M., K.B. Marcu, and P. Zelazowski, *The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility"*. Immunity, 1997. **6**(3): p. 217-23.
77. Yanaba, K., et al., *B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 284-99.
78. Manz, R.A., et al., *Immunological memory stabilizing autoreactivity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **305**: p. 241-57.
79. Martin, F. and A.C. Chan, *B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 467-96.
80. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
81. Symmons, D., et al., *The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century*. Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(7): p. 793-800.
82. Huscher, D., et al., *Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(9): p. 1175-83.
83. Genovese, M.C., et al., *Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition*. N Engl J Med, 2005. **353**(11): p. 1114-23.
84. Maini, R.N. and P.C. Taylor, *Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis*. Annu Rev Med, 2000. **51**: p. 207-29.
85. Lipsky, P.E., *Interleukin-6 and rheumatic diseases*. Arthritis Res Ther, 2006. **8 Suppl 2**: p. S4.
86. Maini, R.N., et al., *Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 2817-29.
87. Bresnihan, B., et al., *Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(12): p. 2196-204.
88. Campion, G.V., et al., *Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis*. The IL-1Ra Arthritis Study Group. Arthritis Rheum, 1996. **39**(7): p. 1092-101.
89. Jiang, Y., et al., *A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(5): p. 1001-9.
90. Weinblatt, M.E., et al., *A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate*. N Engl J Med, 1999. **340**(4): p. 253-9.
91. Bathon, J.M., et al., *A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2000. **343**(22): p. 1586-93.
92. Smolen, J.S., et al., *New therapies for treatment of rheumatoid arthritis*. Lancet, 2007. **370**(9602): p. 1861-74.
93. Scott, S.D., *Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma*. Cancer Pract, 1998. **6**(3): p. 195-7.
94. Popa, C., et al., *Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(4): p. 626-30.

95. Emery, P., et al., *The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(5): p. 1390-400.
96. Edwards, J.C., et al., *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2004. **350**(25): p. 2572-81.
97. Cohen, S.B., et al., *Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 2793-806.
98. Takemura, S., et al., *T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4710-8.
99. Vallerskog, T., et al., *Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE*. Clin Immunol, 2007. **122**(1): p. 62-74.
100. Cambridge, G., et al., *Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(8): p. 2146-54.
101. Teng, Y.K., et al., *Immunohistochemical analysis as a means to predict responsiveness to rituximab treatment*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(12): p. 3909-18.
102. Leandro, M.J., et al., *Bone marrow B-lineage cells in patients with rheumatoid arthritis following rituximab therapy*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(1): p. 29-36.
103. Dorner, T. and G.R. Burmester, *New approaches of B-cell-directed therapy: beyond rituximab*. Curr Opin Rheumatol, 2008. **20**(3): p. 263-8.
104. Dorner, T. and D.M. Goldenberg, *Targeting CD22 as a strategy for treating systemic autoimmune diseases*. Ther Clin Risk Manag, 2007. **3**(5): p. 953-9.
105. Janosy, G., et al., *Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation*. Lancet, 1981. **2**(8251): p. 839-42.
106. Cartron, G., et al., *From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2635-42.
107. Uchida, J., et al., *The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1659-69.
108. Grillo-Lopez, A.J., et al., *Rituximab: ongoing and future clinical development*. Semin Oncol, 2002. **29**(1 Suppl 2): p. 105-12.
109. Edwards, J.C. and G. Cambridge, *B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 394-403.
110. Vieira, P. and K. Rajewsky, *The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice*. Eur J Immunol, 1988. **18**(2): p. 313-6.
111. Talbot, P.J. and M.J. Buchmeier, *Catabolism of homologous murine monoclonal hybridoma IgG antibodies in mice*. Immunology, 1987. **60**(4): p. 485-9.
112. Morell, A., W.D. Terry, and T.A. Waldmann, *Metabolic properties of IgG subclasses in man*. J Clin Invest, 1970. **49**(4): p. 673-80.
113. Amanna, I.J., M.K. Slifka, and S. Crotty, *Immunity and immunological memory following smallpox vaccination*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 320-37.
114. Amanna, I.J., N.E. Carlson, and M.K. Slifka, *Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens*. N Engl J Med, 2007. **357**(19): p. 1903-15.
115. Ochsenbein, A.F., et al., *Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13263-8.
116. Manz, R.A. and A. Radbruch, *Plasma cells for a lifetime?* Eur J Immunol, 2002. **32**(4): p. 923-7.
117. Tew, J.G., R.P. Phipps, and T.E. Mandel, *The maintenance and regulation of the humoral immune response: persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as*

- accessory cells. *Immunol Rev*, 1980. **53**: p. 175-201.
118. Mandel, T.E., et al., *The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity*. *Immunol Rev*, 1980. **53**: p. 29-59.
119. Lanzavecchia, A., et al., *Understanding and making use of human memory B cells*. *Immunol Rev*, 2006. **211**: p. 303-9.
120. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 741-50.
121. Manz, R.A., et al., *Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen*. *Int.Immunol.*, 1998. **10**(11): p. 1703-1711.
122. Hoyer, B.F., et al., *Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice*. *J Exp Med*, 2004. **199**(11): p. 1577-84.
123. Holt, P.G. and S. Leivers, *Radiation-resistant IgE-secreting cells in the mouse: susceptibility to suppressor T cells*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1983. **71**(2): p. 188-90.
124. Ahuja, A., et al., *Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(12): p. 4802-7.
125. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. *Science*, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
126. Nossal, G.J., *One cell, one antibody: prelude and aftermath*. *Immunol Rev*, 2002. **185**: p. 15-23.
127. Schooley, J.C., *Autoradiographic observations of plasma cell formation*. *J Immunol*, 1961. **86**: p. 331-7.
128. McMillan, R., et al., *Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production*. *J Immunol*, 1972. **109**(6): p. 1386-94.
129. Hauser, A.E., et al., *Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response*. *J Immunol*, 2002. **169**(3): p. 1277-82.
130. Ho, F., et al., *Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations*. *Eur J Immunol*, 1986. **16**(10): p. 1297-301.
131. Sze, D.M., et al., *Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival*. *J Exp Med*, 2000. **192**(6): p. 813-21.
132. Smith, K.G., et al., *The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response*. *Embo J*, 1997. **16**(11): p. 2996-3006.
133. Heyman, B., *Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 709-37.
134. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 275-90.
135. Tarlinton, D., et al., *Plasma cell differentiation and survival*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(2): p. 162-9.
136. Brieva, J.A., et al., *Human tonsil, blood and bone marrow in vivo-induced B cells capable of spontaneous and high-rate immunoglobulin secretion in vitro: differences in the requirements for factors and for adherent and bone marrow stromal cells, as well as distinctive adhesion molecule expression*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(2): p. 362-6.
137. Merville, P., et al., *Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts*. *J.Exp.Med.*, 1996. **183**(1): p. 227-236.
138. O'Connor, B.P., et al., *BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells*. *J Exp Med*, 2004. **199**(1): p. 91-8.
139. Tokoyoda, K., et al., *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development*. *Immunity*, 2004. **20**(6): p. 707-18.
140. Cassese, G., et al., *Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals*. *J Immunol*, 2003. **171**(4): p. 1684-90.
141. Pelletier, N., et al., *The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death*

- pathway*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1340-7.
142. Xiang, Z., et al., *FcgammaRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 419-29.
  143. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Plasma-cell homing*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 822-9.
  144. Muehlinghaus, G., et al., *Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells*. Blood, 2005. **105**(10): p. 3965-71.
  145. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes*. Immunity, 2002. **16**(1): p. 1-4.
  146. Kantele, A., et al., *Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 574-9.
  147. Quiding-Jarbrink, M., et al., *Human circulating specific antibody-forming cells after systemic and mucosal immunizations: differential homing commitments and cell surface differentiation markers*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 322-7.
  148. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1033-6.
  149. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
  150. Rangel-Moreno, J., et al., *Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 731-43.
  151. Wehrli, N., et al., *Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes*. Eur J Immunol, 2001. **31**(2): p. 609-16.
  152. Odendahl, M., et al., *Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1614-21.
  153. Blink, E.J., et al., *Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 545-54.
  154. Kantele, A., et al., *Differences in immune responses induced by oral and rectal immunizations with Salmonella typhi Ty21a: evidence for compartmentalization within the common mucosal immune system in humans*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 5630-5.
  155. Hiepe, F. and A. Radbruch, *Is long-term humoral immunity in the mucosa provided by long-lived plasma cells? A question still open*. Eur J Immunol, 2006. **36**(5): p. 1068-9.
  156. Pihlgren, M., et al., *Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 939-46.
  157. Medina, F., et al., *The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression*. Blood, 2002. **99**(6): p. 2154-61.
  158. Odendahl, M., et al., *Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5970-9.
  159. Brieva, J.A., et al., *Human in vivo-induced spontaneous IgG-secreting cells from tonsil, blood and bone marrow exhibit different phenotype and functional level of maturation*. Immunology, 1991. **72**(4): p. 580-3.
  160. Kutteh, W.H., et al., *Production of predominantly polymeric IgA by human peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with mitogens*. J Exp Med, 1980. **152**(5): p. 1424-9.
  161. Kutteh, W.H., S.J. Prince, and J. Mestecky, *Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA*. J Immunol, 1982. **128**(2): p. 990-5.
  162. Czerkinsky, C., et al., *IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence for a common mucosal immune system in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(8): p. 2449-53.
  163. Kosco, M.H., et al., *Antibody-forming cell induction during an early phase of germinal centre*

- development and its delay with ageing.* Immunology, 1989. **68**(3): p. 312-8.
164. Streeter, P.R., B.T. Rouse, and E.C. Butcher, *Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes.* J Cell Biol, 1988. **107**(5): p. 1853-62.
  165. Berg, E.L., et al., *The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor.* J Cell Biol, 1991. **114**(2): p. 343-9.
  166. Hemmerich, S., et al., *Sulfation of L-selectin ligands by an HEV-restricted sulfotransferase regulates lymphocyte homing to lymph nodes.* Immunity, 2001. **15**(2): p. 237-47.
  167. Homeister, J.W., et al., *The alpha(1,3)fucosyltransferases FucT-IV and FucT-VII exert collaborative control over selectin-dependent leukocyte recruitment and lymphocyte homing.* Immunity, 2001. **15**(1): p. 115-26.
  168. Venturi, G.M., et al., *Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release.* Immunity, 2003. **19**(5): p. 713-24.
  169. Faveeuw, C., G. Preece, and A. Ager, *Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases.* Blood, 2001. **98**(3): p. 688-95.
  170. Berlin, C., et al., *alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow.* Cell, 1995. **80**(3): p. 413-22.
  171. Wagner, N., et al., *Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue.* Nature, 1996. **382**(6589): p. 366-70.
  172. Alon, R., et al., *The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1.* J Cell Biol, 1995. **128**(6): p. 1243-53.
  173. Underhill, G.H., et al., *IgG plasma cells display a unique spectrum of leukocyte adhesion and homing molecules.* Blood, 2002. **99**(8): p. 2905-12.
  174. Arce, S., et al., *CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 1022-8.
  175. Streeter, P.R., et al., *A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing.* Nature, 1988. **331**(6151): p. 41-6.
  176. Briskin, M., et al., *Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue.* Am J Pathol, 1997. **151**(1): p. 97-110.
  177. Rott, L.S., M.J. Briskin, and E.C. Butcher, *Expression of alpha4beta7 and E-selectin ligand by circulating memory B cells: implications for targeted trafficking to mucosal and systemic sites.* J Leukoc Biol, 2000. **68**(6): p. 807-14.
  178. Hamann, A., et al., *Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo.* J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3282-93.
  179. Macpherson, A.J., et al., *The immune geography of IgA induction and function.* Mucosal Immunol, 2008. **1**(1): p. 11-22.
  180. Mazo, I.B., et al., *Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1.* J Exp Med, 1998. **188**(3): p. 465-74.
  181. Frenette, P.S., et al., *Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14423-8.
  182. Middleton, J., et al., *Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium.* Blood, 2002. **100**(12): p. 3853-60.
  183. Warnock, R.A., et al., *Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes.* J Exp Med, 1998. **187**(2): p. 205-16.
  184. Bargatze, R.F. and E.C. Butcher, *Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules.* J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 367-72.
  185. Cinamon, G., V. Shinder, and R. Alon, *Shear forces promote lymphocyte migration across*



- vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol*, 2001. **2**(6): p. 515-22.
186. Butcher, E.C., *The Multistep Model of Leukocyte Trafficking: A personal perspective from 15 years later*, in *Leukocyte trafficking*, A. Hamann and B. Engelhardt, Editors. 2005, Wiley-VCH: Weinheim.
  187. Wang, W., et al., *Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2)*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(29): p. 22313-23.
  188. Feng, N., et al., *Redundant role of chemokines CCL25/TECK and CCL28/MEC in IgA+ plasmablast recruitment to the intestinal lamina propria after rotavirus infection*. *J Immunol*, 2006. **176**(10): p. 5749-59.
  189. Hieshima, K., et al., *CC chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 3668-75.
  190. Kunkel, E.J., et al., *CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(7): p. 1001-10.
  191. Lazarus, N.H., et al., *A Common Mucosal Chemokine (Mucosae-Associated Epithelial Chemokine/CCL28) Selectively Attracts IgA Plasmablasts*. *J Immunol*, 2003. **170**(7): p. 3799-805.
  192. Pabst, O., et al., *Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine*. *J Exp Med*, 2004. **199**(3): p. 411-6.
  193. Bowman, E.P., et al., *The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells*. *J Exp Med*, 2002. **195**(2): p. 269-75.
  194. Kunkel, E.J., D.J. Campbell, and E.C. Butcher, *Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity*. *Microcirculation*, 2003. **10**(3-4): p. 313-23.
  195. Bleul, C.C., et al., *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. *J Exp Med*, 1996. **184**(3): p. 1101-9.
  196. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. *Nature*, 1996. **382**(6594): p. 829-33.
  197. Agace, W.W., et al., *Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation*. *Curr Biol*, 2000. **10**(6): p. 325-8.
  198. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
  199. Ma, Q., D. Jones, and T.A. Springer, *The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment*. *Immunity*, 1999. **10**(4): p. 463-71.
  200. Hargreaves, D.C., et al., *A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements*. *J Exp Med*, 2001. **194**(1): p. 45-56.
  201. Luther, S.A., et al., *Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis*. *J Immunol*, 2002. **169**(1): p. 424-33.
  202. Cassese, G., et al., *Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(9): p. 2726-32.
  203. Flier, J., et al., *The CXCR3 activating chemokines IP-10, Mig, and IP-9 are expressed in allergic but not in irritant patch test reactions*. *J Invest Dermatol*, 1999. **113**(4): p. 574-8.
  204. Janatpour, M.J., et al., *Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment*. *J Exp Med*, 2001. **194**(9): p. 1375-84.
  205. Tsubaki, T., et al., *Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **141**(2): p. 363-71.
  206. Seedat, J., ed. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 30 des Robert-Koch-Instituts*. 2008, Robert-Koch-Institut: Berlin.

207. van der Heijde, D.M., et al., *Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists*. J Rheumatol, 1993. **20**(3): p. 579-81.
208. Prevoo, M.L., et al., *Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(1): p. 44-8.
209. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
210. Perfetto, S.P., P.K. Chattopadhyay, and M. Roederer, *Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 648-55.
211. Tung, J.W., et al., *New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data*. Clin Immunol, 2004. **110**(3): p. 277-83.
212. Herzenberg, L.A., et al., *Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p. 681-5.
213. Mei, H., *Analyse humaner B-Effektorzellen*. 2003: Berlin
214. Jacobi, A.M., et al., *Correlation between circulating CD27<sup>high</sup> plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(5): p. 1332-42.
215. Roederer, M., *How many events is enough? Are you positive?* Cytometry A, 2008. **73**(5): p. 384-5.
216. Makoff, A.J., et al., *Expression of tetanus toxin fragment C in E. coli: high level expression by removing rare codons*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(24): p. 10191-202.
217. Fairweather, N.F., et al., *Cloning, nucleotide sequencing, and expression of tetanus toxin fragment C in Escherichia coli*. J.Bacteriol., 1986. **165**(1): p. 21-27.
218. Liao, F., et al., *Human B cells become highly responsive to macrophage-inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand-20 after cellular activation without changes in CCR6 expression or ligand binding*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 4871-80.
219. Fedyk, E.R., et al., *Maturation decreases responsiveness of human bone marrow B lineage cells to stromal-derived factor 1 (SDF-1)*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(4): p. 667-73.
220. Siveke, J.T. and A. Hamann, *T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 550-4.
221. Omede, P., et al., *Multiple myeloma: 'early' plasma cell phenotype identifies patients with aggressive biological and clinical characteristics*. Br J Haematol, 1993. **85**(3): p. 504-13.
222. Trentin, L., et al., *The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 115-21.
223. Nakayama, T., et al., *Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1136-40.
224. Johansson, C., et al., *Differential expression of chemokine receptors on human IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> B cells*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(2): p. 279-87.
225. Czerkinsky, C.C., et al., *A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 109-21.
226. Kantele, J.M., et al., *Mucosally activated circulating human B cells in diarrhea express homing receptors directing them back to the gut*. Gastroenterology, 1996. **110**(4): p. 1061-7.
227. Amanna, I.J. and M.K. Slifka, *Quantitation of rare memory B cell populations by two independent and complementary approaches*. J Immunol Methods, 2006. **317**(1-2): p. 175-85.
228. Greiner, A., et al., *Characterization of Wue-1, a novel monoclonal antibody that stimulates the growth of plasmacytoma cell lines*. Virchows Arch, 2000. **437**(4): p. 372-9.
229. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers, *Human immunoglobulin (Ig)M<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells*. J.Exp.Med., 1998. **188**(9): p.

- 1679-1689.
230. Qin, S., et al., *The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 746-54.
  231. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 565-8.
  232. Wrammert, J., et al., *Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 667-71.
  233. Kantele, A., et al., *Homing potentials of circulating antibody-secreting cells after administration of oral or parenteral protein or polysaccharide vaccine in humans*. Vaccine, 1999. **17**(3): p. 229-36.
  234. Gonzalez-Garcia, I., et al., *Increased survival is a selective feature of human circulating antigen-induced plasma cells synthesizing high-affinity antibodies*. Blood, 2008. **111**(2): p. 741-9.
  235. Gonzalez-Garcia, I., et al., *Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4042-50.
  236. Briskin, M.J., L. Rott, and E.C. Butcher, *Structural requirements for mucosal vascular addressin binding to its lymphocyte receptor alpha 4 beta 7. Common themes among integrin-Ig family interactions*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 719-26.
  237. Berlin, C., et al., *Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1*. Cell, 1993. **74**(1): p. 185-95.
  238. Wilson, E. and E.C. Butcher, *CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 805-9.
  239. Homey, B., et al., *CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation*. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 157-65.
  240. Kantele, A.M., R. Takanen, and H. Arvilommi, *Immune response to acute diarrhea seen as circulating antibody-secreting cells*. J Infect Dis, 1988. **158**(5): p. 1011-6.
  241. Stasi, R., et al., *Long-term observation of 208 adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Am J Med, 1995. **98**(5): p. 436-42.
  242. Najean, Y., et al., *The site of platelet destruction in thrombocytopenic purpura as a predictive index of the efficacy of splenectomy*. Br J Haematol, 1991. **79**(2): p. 271-6.
  243. Martinez-Gamboa, L., et al., *Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura*. Clin Immunol, 2009. **130**(2): p. 199-212.
  244. Gugliotta, L., et al., *Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): site of platelet sequestration and results of splenectomy. A study of 197 patients*. Scand J Haematol, 1981. **26**(5): p. 407-12.
  245. George, J.N., et al., *Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology*. Blood, 1996. **88**(1): p. 3-40.
  246. Fagraeus, A., *The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro*. J Immunol, 1948. **58**: p. 1-3.
  247. Mohr, E., et al., *Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2113-23.
  248. Manz, R.A., et al., *Maintenance of serum antibody levels*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 367-86.
  249. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 231-64.
  250. Jego, G., R. Bataille, and C. Pellat-Deceunynck, *Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts*. Blood, 2001. **97**(6): p. 1817-1822.
  251. Huard, B., et al., *APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2887-95.

252. Belnoue, E., et al., *APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2755-64.
253. Johansen, F.E., et al., *Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and mucosal effector sites: dispersion from tonsils*. Blood, 2005. **106**(2): p. 593-600.
254. Cupps, T.R., et al., *Activation of human peripheral blood B cells following immunization with hepatitis B surface antigen vaccine*. Cell Immunol, 1984. **86**(1): p. 145-54.
255. Kantele, A., H. Arvilommi, and I. Jokinen, *Specific immunoglobulin-secreting human blood cells after peroral vaccination against Salmonella typhi*. J Infect Dis, 1986. **153**(6): p. 1126-31.
256. Kantele, A., *Antibody-secreting cells in the evaluation of the immunogenicity of an oral vaccine*. Vaccine, 1990. **8**(4): p. 321-6.
257. Kantele, A., et al., *Active immunity is seen as a reduction in the cell response to oral live vaccine*. Vaccine, 1991. **9**(6): p. 428-31.
258. Kantele, A., et al., *Antibody-secreting cells in acute urinary tract infection as indicators of local immune response*. J Infect Dis, 1994. **169**(5): p. 1023-8.
259. Kantele, A., et al., *Unique characteristics of the intestinal immune system as an inductive site after antigen reencounter*. J Infect Dis, 2005. **191**(2): p. 312-7.
260. Kehrl, J.H. and A.S. Fauci, *Activation of human B lymphocytes after immunization with pneumococcal polysaccharides*. J Clin Invest, 1983. **71**(4): p. 1032-40.
261. Munoz, J.L. and R.A. Insel, *In vitro human antibody production to the Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide*. J Immunol, 1987. **139**(6): p. 2026-31.
262. Quiding-Jarbrink, M., et al., *Homing commitment of lymphocytes activated in the human gastric and intestinal mucosa*. Gut, 2001. **49**(4): p. 519-25.
263. Quiding-Jarbrink, M., et al., *Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. A molecular basis for the compartmentalization of effector B cell responses*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1281-6.
264. Stevens, R.H., et al., *Characterization of a circulating subpopulation of spontaneous antitetanus toxoid antibody producing B cells following in vivo booster immunization*. J Immunol, 1979. **122**(6): p. 2498-504.
265. Yarchoan, R., et al., *In vitro production of anti-influenza virus antibody after intranasal inoculation with cold-adapted influenza virus*. J Immunol, 1981. **127**(5): p. 1958-63.
266. Bernasconi, N.L., N. Onai, and A. Lanzavecchia, *A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4500-4.
267. Ettinger, R., et al., *IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2872-82.
268. Schneider, S., et al., *Simultaneous cytometric analysis of (auto)antigen-reactive T and B cell proliferation*. Immunobiology, 2002. **206**(5): p. 484-95.
269. Tangye, S.G., D.T. Avery, and P.D. Hodgkin, *A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 261-9.
270. Odendahl, M., et al., *Perturbations of peripheral B lymphocyte homeostasis in children with systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(9): p. 851-8.
271. Ridley, R.C., et al., *Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen*. Blood, 1993. **81**(3): p. 767-74.
272. van der Giessen, M. and O. Groenboer-Kempers, *The subclasses of human IgG antibodies against tetanus toxoid*. Clin Exp Immunol, 1976. **25**(1): p. 117-21.
273. Carrel, S., et al., *Human tetanus antibodies: Isolation and characterization with special reference to the IgG subclasses*. FEBS Lett, 1972. **19**(4): p. 305-307.
274. Cerutti, A., *The regulation of IgA class switching*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 421-34.

275. Dahan, S., et al., *Epithelia: lymphocyte interactions in the gut*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 243-53.
276. Nie, Y., et al., *The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity*. J Exp Med, 2004. **200**(9): p. 1145-56.
277. Koch, G., B.D. Lok, and R. Benner, *Antibody formation in mouse bone marrow during secondary type responses to various thymus-independent antigens*. Immunobiology, 1982. **163**(5): p. 484-96.
278. Koch, G., et al., *The mechanism of thymus-dependent antibody formation in bone marrow*. J Immunol, 1981. **126**(4): p. 1447-51.
279. Ratajczak, M.Z., et al., *The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis*. Leukemia, 2006. **20**(11): p. 1915-24.
280. Katayama, Y., et al., *Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow*. Cell, 2006. **124**(2): p. 407-21.
281. Ueda, Y., et al., *Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 47-58.
282. Mendez-Ferrer, S., et al., *Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations*. Nature, 2008. **452**(7186): p. 442-7.
283. Kishimoto, T.K., et al., *Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors*. Science, 1989. **245**(4923): p. 1238-41.
284. Garside, P., et al., *Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node*. Science, 1998. **281**(5373): p. 96-9.
285. O'Garra, A. and K. Murphy, *Role of cytokines in determining T-lymphocyte function*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(3): p. 458-66.
286. Medina, F., et al., *Isolation, maturational level, and functional capacity of human colon lamina propria plasma cells*. Gut, 2003. **52**(3): p. 383-9.
287. Bachmann, M.F., et al., *Regulation of IgG antibody titers by the amount persisting of immune-complexed antigen*. Eur J Immunol, 1994. **24**(10): p. 2567-70.
288. Hofer, T., et al., *Adaptation of humoral memory*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 295-302.
289. Jacobi, A.M., et al., *HLA-DR<sup>high</sup>/CD27<sup>high</sup> plasmablasts indicate active disease in patients with SLE*. Ann Rheum Dis, 2009.
290. Alexander, T., et al., *Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system*. Blood, 2009. **113**(1): p. 214-23.
291. Battafarano, D.F., et al., *Antigen-specific antibody responses in lupus patients following immunization*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(10): p. 1828-34.
292. Ravetch, J.V. and M. Nussenzweig, *Killing some to make way for others*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 337-9.
293. Farstad, I.N., et al., *Immunoglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics*. Immunology, 2000. **101**(3): p. 354-63.
294. Trepel, F., *Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis*. Klin Wochenschr, 1974. **52**(11): p. 511-5.
295. Pabst, R., M.W. Russell, and P. Brandtzaeg, *Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut*. Trends Immunol, 2008. **29**(5): p. 206-8; author reply 209-10.
296. Ganusov, V.V. and R.J. De Boer, *Do most lymphocytes in humans really reside in the gut?* Trends Immunol, 2007. **28**(12): p. 514-8.
297. Dullaers, M., et al., *A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 120-9.
298. Coffman, R.L., D.A. Lebman, and B. Shrader, *Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes*. J Exp Med,

1989. **170**(3): p. 1039-44.
299. Sonoda, E., et al., *Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production*. J Exp Med, 1989. **170**(4): p. 1415-20.
300. He, B., et al., *Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 812-26.
301. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 822-9.
302. Mora, J.R., et al., *Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells*. Science, 2006. **314**(5802): p. 1157-60.
303. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1662-5.
304. Tezuka, H., et al., *Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells*. Nature, 2007. **448**(7156): p. 929-33.
305. Xu, W., et al., *Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 294-303.
306. Brandtzaeg, P., E.S. Baekkevold, and H.C. Morton, *From B to A the mucosal way*. Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1093-4.
307. Schippers, A., et al., *Mucosal Addressin Cell-Adhesion Molecule-1 Controls Plasma-Cell Migration and Function in the Small Intestine of Mice*. Gastroenterology, 2009.
308. Jaimes, M.C., et al., *Maturation and trafficking markers on rotavirus-specific B cells during acute infection and convalescence in children*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10967-76.
309. Williams, M.B., et al., *The memory B cell subset responsible for the secretory IgA response and protective humoral immunity to rotavirus expresses the intestinal homing receptor, alpha4beta7*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 4227-35.
310. Kuklin, N.A., et al., *Protective intestinal anti-rotavirus B cell immunity is dependent on alpha 4 beta 7 integrin expression but does not require IgA antibody production*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1894-902.
311. Youngman, K.R., et al., *Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2173-81.
312. Pan, J., et al., *A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 2943-9.
313. Homey, B., et al., *Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC)*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3465-70.
314. Morales, J., et al., *CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14470-5.
315. Miles, A., et al., *CCL25 and CCL28 promote alpha4 beta7-integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(5): p. G1257-67.
316. Macpherson, A.J., et al., *A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria*. Science, 2000. **288**(5474): p. 2222-6.
317. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 478-85.
318. Zaballos, A., et al., *Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5671-5.
319. Mora, J.R. and U.H. von Andrian, *Differentiation and homing of IgA-secreting cells*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(2): p. 96-109.
320. Abitorabi, M.A., et al., *Differential expression of homing molecules on recirculating lymphocytes from sheep gut, peripheral, and lung lymph*. J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3111-7.

321. Macpherson, A.J., et al., *IgA production without mu or delta chain expression in developing B cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 625-31.
322. Wardemann, H., et al., *B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 771-80.
323. Kruetzmann, S., et al., *Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen*. J Exp Med, 2003. **197**(7): p. 939-45.
324. Hansen, K. and D.B. Singer, *Asplenic-hyposplenic overwhelming sepsis: postsplenectomy sepsis revisited*. Pediatr Dev Pathol, 2001. **4**(2): p. 105-21.
325. Casola, S., et al., *B cell receptor signal strength determines B cell fate*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 317-27.
326. Cebra, J.J., et al., *Are Peyer's patch germinal centre reactions different from those occurring in other lymphoid tissues?* Res Immunol, 1991. **142**(3): p. 222-6.
327. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 361-7.
328. Rimoldi, M., et al., *Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 507-14.
329. Mattioli, C.A. and T.B. Tomasi, Jr., *The life span of IgA plasma cells from the mouse intestine*. J Exp Med, 1973. **138**(2): p. 452-60.
330. Macpherson, A.J. and E. Slack, *The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(6): p. 673-8.
331. Corthesy, B., *Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis?* J Immunol, 2007. **178**(1): p. 27-32.
332. Suzuki, K., et al., *Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1981-6.
333. Fagarasan, S., et al., *Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1424-7.
334. Proudfoot, A.E., *Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 106-15.
335. Burger, J.A. and A. Peled, *CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers*. Leukemia, 2009. **23**(1): p. 43-52.
336. von Andrian, U.H. and B. Engelhardt, *Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease*. N Engl J Med, 2003. **348**(1): p. 68-72.
337. Singh, U.P., et al., *CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2007. **7**(2): p. 111-23.
338. van Egmond, M., et al., *FcalphaRI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity*. Nat Med, 2000. **6**(6): p. 680-5.
339. Monteiro, R.C. and J.G. Van De Winkel, *IgA Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 177-204.
340. Mei, H.E., et al., *Phenotypic analysis of B-cells and plasma cells*. Methods Mol Med, 2007. **136**: p. 3-18.
341. Dass, S., et al., *Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(10): p. 2993-9.
342. Kneitz, C., M. Wilhelm, and H.P. Tony, *Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases*. Immunobiology, 2002. **206**(5): p. 519-27.
343. Breedveld, F., et al., *Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response*. J Clin Pharmacol, 2007. **47**(9): p. 1119-28.
344. Rastetter, W., A. Molina, and C.A. White, *Rituximab: expanding role in therapy for lymphomas and autoimmune diseases*. Annu Rev Med, 2004. **55**: p. 477-503.
345. Teng, Y.K., et al., *Residual inflammation after rituximab treatment is associated with sustained*

- synovial plasma cell infiltration and enhanced B-cell repopulation.* Ann Rheum Dis, 2008.
346. Hoyer, B.F., et al., *Long-lived plasma cells and their contribution to autoimmunity.* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1050**: p. 124-33.
  347. van Venrooij, W.J., J.J. van Beers, and G.J. Pruijn, *Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 268-85.
  348. Reff, M.E., et al., *Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20.* Blood, 1994. **83**(2): p. 435-45.
  349. Vugmeyster, Y., et al., *Depletion of B cells by a humanized anti-CD20 antibody PRO70769 in Macaca fascicularis.* J Immunother, 2005. **28**(3): p. 212-9.
  350. Hamaguchi, Y., et al., *The peritoneal cavity provides a protective niche for B1 and conventional B lymphocytes during anti-CD20 immunotherapy in mice.* J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4389-99.
  351. Gong, Q., et al., *Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy.* J Immunol, 2005. **174**(2): p. 817-26.
  352. Hamel, K., et al., *Suppression of proteoglycan-induced arthritis by anti-CD20 B Cell depletion therapy is mediated by reduction in autoantibodies and CD4+ T cell reactivity.* J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4994-5003.
  353. Cioc, A.M., et al., *Rituximab-induced changes in hematolymphoid tissues found at autopsy.* Am J Clin Pathol, 2008. **130**(4): p. 604-12.
  354. Mamani-Matsuda, M., et al., *The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells.* Blood, 2008. **111**(9): p. 4653-9.
  355. Withers, D.R., et al., *T cell-dependent survival of CD20+ and CD20- plasma cells in human secondary lymphoid tissue.* Blood, 2007. **109**(11): p. 4856-64.
  356. Gelinck, L.B., et al., *Poor serological responses upon influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab.* Ann Rheum Dis, 2007. **66**(10): p. 1402-3.
  357. van der Kolk, L.E., et al., *Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness.* Blood, 2002. **100**(6): p. 2257-9.
  358. Paran, D., L. Trej'ò, and D. Caspi, *Clinical images: B cell depletion in the appendix following rituximab treatment.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(7): p. 2151.
  359. Fagarasan, S. and T. Honjo, *Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 63-72.
  360. Liu, Y.J., et al., *Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2.* Immunity, 1995. **2**(3): p. 239-48.
  361. Shimoda, M., et al., *Isotype-specific selection of high affinity memory B cells in nasal-associated lymphoid tissue.* J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1597-607.
  362. Spencer, J., et al., *The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells.* Clin Exp Immunol, 1985. **62**(3): p. 607-12.
  363. Laichalk, L.L., et al., *The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection.* Immunity, 2002. **16**(5): p. 745-54.
  364. Klein, U., et al., *Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells.* Immunol.Rev.80, 1998. **162**: p. 261-2.



## Anhang

### Berechnungen

#### Rechnung 1

Die Berechnung, wie zirkulierende Plasmablasten auf die Anzahl der Knochenmarksplasmazellen Einfluss nehmen würde, wenn sie mit diesen erfolgreich um begrenzte Überlebensnischen konkurrierten, beruht auf

- i) der mittleren Anzahl zirkulierender Plasmablasten und Plasmazellen (2.307/ml),
- ii) der mittleren Frequenz IgG<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen unter ihnen (4,9 %, Bereich 3,5-6,2 %, 5 Probanden, ohne Abb.),
- iii) der Frequenz der Plasmazellen unter den Lymphozyten des Knochenmarks (1,1 %) und der Frequenz IgG-sezernierender Zellen unter ihnen (55 %),
- iv) der Zeit, die ein Plasmablast oder eine (dislozierte) Plasmazelle im Blut nachweisbar ist (1 Tag),
- v) der Anzahl von Lymphozyten im Knochenmark eines Menschen ( $5 \times 10^{10}$ ) [294],
- vi) dem geschätzten Blutvolumen eines Menschen (5 Liter).

5 % IgG<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>schwach</sup> Plasmazellen von 2.307 antikörpersezernierenden Zellen je ml x 5.000 ml Blut ergeben  $5,75 \times 10^5$  IgG<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>schwach</sup> zirkulierende Plasmazellen zu einem beliebigen Zeitpunkt. Wären dies dislozierte Knochenmarksplasmazellen, würde es 263 Tage dauern um 50 % der  $5,5 \times 10^8$  IgG-sezernierenden Knochenmarkzellen (55 % von 1,1 % von  $5 \times 10^{10}$  Lymphozyten) zu verlieren, was mit einer entsprechenden Reduktion antigenspezifischer Serum-IgG-Titer einhergehen würde. Dies steht im Gegensatz zur beobachteten Stabilität des humoralen Gedächtnisses, denn die Halbwertszeit antigenspezifischer Serum-IgG-Titer wurde mit > 10 Jahren bestimmt [114]. Dies widerlegt die Annahme, dass Plasmablasten, die während des immunologischen Ruhezustands generiert wurden, erfolgreich um die von Knochenmarksplasmazellen besetzten Überlebensnischen konkurrieren können.

### Rechnung 2

Die Approximation der (Mindest-) Anzahl frisch generierter Plasmablasten unter B-Zell-Depletion beruht auf

- i) der mittleren Anzahl zirkulierender Plasmablasten und Plasmazellen 2 Monate nach RTX-Infusion, was der geringsten mittleren Anzahl während der gesamten Depletionsphase entspricht (zusammen 390/ml),
- ii) der mittleren Frequenz von mindestens 50 % HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten unter ihnen (Abb. 41A, Tabelle 8),
- iii) der Zeit, die ein Plasmablast im Blut nachweisbar ist (1 Tag),
- iv) der Dauer der B-Zell-Depletion (548 Tage),
- iv) dem geschätzten Blutvolumen eines Menschen (5 Liter).

Der Anteil von 50 % HLA-DR<sup>stark</sup> Plasmablasten von insgesamt > 390 Plasmablasten + Plasmazellen/ml Blut ergibt > 195 Plasmablasten/ml. In 5 Litern Blut zirkulieren somit unter B-Zell-Depletion mindestens  $195 \times 5000 = 9,75 \times 10^5$  Plasmablasten zu einem gegebenen Zeitpunkt. Diese Anzahl Plasmablasten wurde im Mittel zu keinem anderen Messzeitpunkt unterschritten. Wird sie über die gesicherte Depletionsphase von 548 Tagen als Minimumwert angenommen, ergibt sich für diesen Zeitraum eine Produktion von mindestens  $548 \times 9,75 \times 10^5 \approx 5,3 \times 10^8$  Plasmablasten. Das entspricht der 10-40-fachen Menge zirkulierender tetanusspezifischer Plasmablasten, die aus einer einzelnen sekundären Tetanusimmunisierung hervorgeht [288] und etwa 1-10 % der (kontrovers diskutierten) Gesamtzahl der Plasmazellen in den mukosa-assoziierten Lymphgeweben [295, 296]. Somit findet unter Bedingungen der B-Zell-Depletion mit RTX die autonome, höchstwahrscheinlich mukosale Produktion einer signifikanten Anzahl von Plasmablasten statt.

## Abkürzungen und Maßeinheiten

Die Tabellen 2 und 4 enthalten Erläuterungen weiterer Abkürzungen.

Abkürzung	Bedeutung	ggf. deutsche Entsprechung / Erläuterung
AITP	Autoimmunthrombozytopenie	
(ds)DNA	(double stranded) desoxyribonucleic acid	(doppelsträngige) Desoxyribonukleinsäure
(m)RNA	(messenger) ribonucleic acid	(Boten-)Ribonukleinsäure
°C	Grad Celsius	
Abb	Abbildung	
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol	
AMP	2-Amino-2-methyl-1-propanol	
AP	alkalische Phosphatase	
APRIL	a proliferation inducing ligand	
BAFF	B cell activating factor	B-Zell-aktivierender Faktor
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat	
bcl	b cell lymphoma	
BD	Becton, Dickinson and Company	
Bio	Biotin	
BSA	bovine serum albumin	Rinderserumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor	
bzw.	beziehungsweise	
CCL/R	C-C motif ligand/receptor	C-C-Motiv-Ligand/Rezeptor
CD	cluster of differentiation	
CXCL/R	C-X-C motif ligand/receptor	C-X-C-Motiv-Ligand&Rezeptor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	
DAS28	disease activity score 28	Krankheitsaktivitätsindex für RA
dd	doppelt destilliert	
Dig	Digoxigenin	
DMF	N,N-Dimethylformamid	
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum	
E. coli	Escherischia coli	
EDTA	(Dikalium-) Ethylendiamintetraessigsäure	
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzymgekoppeltes Immunadsorptionsexperiment
EliSpot	enzyme-linked immunospot assay	
et al.	et alii (lat.)	und andere
Fab	fragment antigen binding	antigenbindendes Fragment
FACS	fluorescence activated /assisted cell sorting	fluoreszenzaktivierte (assistierte) Zellsortierung
Fc	fragment crystallizable	kristallisierbares Fragment
FCγRIIB	IgG-Fc-Rezeptor II B	
FMO	fluorescence-minus-one	(Gesamt-)Fluoreszenz-minus-eins
FSC (-A, -H)	forward scatter (-area, -height)	Vorwärtsstreulicht (Peakfläche, Peakhöhe)
g	Gramm	
h	hour(s)	Stunde(n)
HbsAg	Hepatitis B surface antigen	Hepatitis B Oberflächenantigen
HepB	Hepatitis B	
HIV	human immunodeficiency virus	HI-Virus
HLA-DR, MHC II	human leukocyte antigen-DR major histocompatibility complex II	humanes Leukozytenantigen DR Haupthistokompatibilitätskomplex II
HRP	horseradish peroxidase	Meerrettich-Peroxidase
I. E.	internationale Einheiten	
IFN	Interferon	

## Anhang

IgA (-G, -M, -D, -E)	Immunglobulin A (G, M, D, E)	
IL	Interleukin	
iz	intrazellulär	
J-Kette	(„joining“) verbindende Kette	
k. A.	keine Angabe	
kDa	Kilodalton	
KM	Knochenmark	
l	Liter	
LF	limit of flocculation	Ausflockungsgrenze
M	molar	
MadCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1	
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität	
min	Minute(n)	
ml	Milliliter	
mM	millimolar	
nM	nanomolar	
nm	Nanometer	
PB	Plasmablast(en)	
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	
PBS	phosphate buffered saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
plgR	Rezeptor für polymeres Immunglobulin	
PNA <sub>d</sub>	peripheral lymph node addressin	
PnPP	<i>P</i> -Nitrophenylphosphat	
PZ	Plasmazelle(n)	
RA	rheumatoide Arthritis	
RF	Rheumafaktor	
rpm	rounds per minute	Umdrehungen je Minute
RPMI 1640	Roswell Memorial Park Medium 1640	
RT	Raumtemperatur	
rTT.C	recombinant tetanus toxin C fragment	rekombinantes Tetanustoxin C-Fragment
RTX	Rituximab	
SA	Streptavidin	
SLE	systemischer Lupus erythematoses	
SSC	sideward scatter	Seitwärtsstreulicht
ssp.	Subspecies (lat.)	Unterart(en)
TLR	toll like receptor	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor (-Superfamilie)	
TT	Tetanustoxoid	
U	units	Einheiten
u. a.	unter anderem	
v. a.	vor allem	
v/v	Volumen/Volumen	
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	
x g	-fache Erdbeschleunigung g	
µg	Mikrogramm	
µl	Mikroliter	
µm	Mikrometer	

## Veröffentlichungen und Weiterbildung im Rahmen der Promotion

### Publizierte Artikel

- **Mei H**, Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz RA, Radbruch A, Dörner T. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2461-9
- Jacobi AM, **Mei H**, Hoyer B, Mumtaz IM, Thiele K, Radbruch AH, Burmester GR, Hiepe F, Dörner T. HLA-DR<sup>high</sup>/CD27<sup>high</sup> plasmablasts indicate active disease in patients with SLE. *Ann Rheum Dis*. 2009 Feb 5 (Epub ahead of print)
- Martinez-Gamboa L, **Mei H**, Loddenkemper C, Ballmer B, Hansen A, Lipsky PE, Emmerich F, Radbruch A, Salama A, Dörner T. Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura. *Clin Immunol*. 2009 Feb;130(2):199-212
- Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, **Mei H**, Radtke H, Gromnica-Ihle E, Burmester GR, Arnold R, Radbruch A, Hiepe F. Depletion of autoreactive immunological memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):214-23.
- Hostmann A, Jacobi AM, **Mei H**, Hiepe F, Dörner T. Peripheral B cell abnormalities and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008 Dec;17(12):1064-9.
- Moser K, Muehlinghaus G, Manz R, **Mei H**, Voigt C, Yoshida T, Dörner T, Hiepe F, Radbruch A. Long-lived plasma cells in immunity and immunopathology. *Immunol Lett*. 2006 103:83-85
- Höfer T, Muehlinghaus G, Moser K, Yoshida T, **Mei H**, Hebel K, Hauser A, Hoyer B, Luger E, Dörner T, Manz R, Hiepe F, Radbruch A. Adaptation of humoral memory. *Immunological Reviews*. 2006 211:295-302
- Odendahl M, **Mei H**, Hoyer B, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Dörner T, Radbruch A. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005 105:1614-1621.

Publizierte Buchkapitel

- **Mei H**, Yoshida T, Muehlinghaus G, Hiepe F, Dörner T, Radbruch A, Hoyer B. Phenotypic analysis of B cells and plasma cells. in Andrew P. Cope (ed). Methods in Molecular Medicine. Arthritis research. Vol. 2. Humana Press, 2007

Zur Publikation eingereichte Artikel

- Chu VT, **Mei H**, Dörner T, Berek C et al. Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells of SLE patients.

Vorträge

- **Henrik Mei:** Differential kinetics of plasma cell subsets during B cell depletion in RA. 4. AR.O.S.A. Expertenworkshop Rheumatologie, Berlin-Köpenick, Deutschland, 27. 6. 2009
- **Henrik Mei:** Distinct regulation of humoral memory by tissue-specific homing of peripheral blood plasmablasts. EULAR Jahreskongress, Kopenhagen, Dänemark, 12. 6. 2009
- **Henrik Mei:** Blood-borne human plasma cells are generated in mucosal immune responses and independent of circulating CD20<sup>+</sup> B cells. 7. B-Zell-Forum der DGfI, Salzburg, Österreich, 8. 5. 2009
- **Henrik Mei:** B-cells as therapeutic target in connective tissue diseases. 43rd Annual meeting of the European Society for Clinical Investigation (ESCI), Frankfurt am Main, Deutschland, 2. 4. 2009
- **Henrik Mei:** Human plasmablasts generated in steady state are derived from mucosal immune responses and persist therapeutic B cell depletion. Keystone meeting „B cells in context“, Taos NM, USA, 27. 2. 2009
- **Henrik Mei:** Delineation of plasmablasts generated in steady state and in systemic immune responses. Jahrestreffen des MUVAPRED-Programms (EU), Siena, Italien, 28. 11. 2008

- **Henrik Mei:** Delineation of plasmablast characteristics generated in steady state and in systemic immune responses. Jahrestreffen der DGfI/ÖGAI, Wien, Österreich, 4. 9. 2008
- **Henrik Mei:** Functional diversity of plasmablasts and plasma cells in steady state and after systemic vaccination. 6. B-Zell-Forum der DGfI, Bad Eibsee, Deutschland, 11. 4. 2008
- **Henrik Mei:** Functional diversity of plasmablasts and plasma cells in steady state and after systemic vaccination, DRFZ Laborseminar, Berlin, Deutschland, 26. 2. 2008
- **Henrik Mei:** Functional diversity of plasmablasts and plasma cells in steady state and after systemic vaccination. 3. MASIR Konferenz, La Plagne, Frankreich, 2. 2. 2008
- **Henrik Mei:** Distinct nature of plasma cells generated in steady state vs. vaccination in man. SFB 421-Kolloquium, Zeuthen, Deutschland, 2. 11. 2007
- **Henrik Mei:** Heterogeneity in circulating antibody-secreting cells and characteristics of antigen-specific cells. DRFZ Laborseminar, Berlin, Deutschland, 21. 2. 2006

*Ausgewählte Posterpräsentationen (als präsentierender Autor)*

- **Mei H,** Reiter K, Frölich D, Tony HP, Radbruch A, Dörner T.: Peripheral blood plasmablasts and plasma cells in rheumatoid arthritis patients treated with the anti CD20 antibody Rituximab. EULAR Jahreskongress 2009, Kopenhagen, Dänemark, 12. 6. 2009
- **Mei H,** Yoshida T, Wondossen S, Frölich D, Thiele K, Tony HP, Hiepe F, Radbruch A, Dörner T. Blood-borne human plasma cells are derived from mucosal immune responses and are refractory to therapeutic B cell depletion. 2009 Keystone meeting „B cells in context“, Taos, NM, USA, 26. 2. 2009
- **Mei H,** Reiter K, Frölich D, Tony HP, Radbruch A, Dörner T. Persistent Generation of Plasmablasts in B cell depleted Patients with Rheumatoid Arthritis. 2008 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, 27. 10. 2008
- **Mei H,** Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz RA, Radbruch A, Dörner T. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal

immune responses. 36. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Berlin, Deutschland, 24. - 27. 9. 2008

- **Mei H**, Yoshida T, Hoyer BF, Hiepe F, Radbruch A, Dörner T. Heterogeneity of peripheral immunoglobulin-secreting cells in steady state and after systemic vaccination. 7. European Lupus Meeting, Amsterdam, Niederlande, 7. - 10. 5. 2008
- **Mei H**, Yoshida T, Wondossen S, Hiepe F, Radbruch A, Dörner T. Functional diversity of plasmablasts and plasma cells in steady state and after systemic vaccination. 6. B-Zell-Forum der DGfI, Grainau/Bad Eibsee, Deutschland, 10. - 12. 4. 2008
- **Mei H**, Radbruch A, Dörner T. Functional diversity of plasmablasts and plasma cells in steady state and after systemic vaccination. 4. Spring school of Immunology, Ettal, Deutschland, 3. - 7. 3. 2008
- Martinez-Gamboa L, **Mei H**, Huebner J, Ballmer B, Hostmann A, Hansen A, Emmerich F, Radbruch A, Salama A, Dörner T. Role of the spleen for peripheral B cell homeostasis. 3. MASIR Konferenz, La Plagne, Frankreich, 30. 1. - 2. 2. 2008
- **Mei H**, Radbruch A, Dörner T. Functional diversity of plasmablasts and plasma cells in steady state and after systemic vaccination. MIVAC/MUVAPRED Konferenz, Göteborg, Schweden, 19. - 22. 1. 2008
- **Mei H**, Yoshida T, Radbruch A, Hiepe F, Dörner T. Functional diversity of plasmablasts and plasma cells in steady state and after systemic vaccination. 5. B-Zell-Forum der DGfI, Bad Bevensen, Deutschland, 30. 4. - 2. 5. 2007

### Preise und Stipendien

- Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Berlin, Deutschland, 27. 9. 2008
- Reisestipendium der GlaxoSmithKline Stiftung, Januar 2008



Artikel in Vorbereitung (Arbeitstitel)

- **Mei H\***, Yoshida T\*, Hiepe F, Dörner T, Radbruch A. The fate of HLA-DR<sup>low</sup> plasma cells mobilized within a secondary immune response. (\*gleichrangige Autorenschaft)
- **Mei H**, Frölich D, Tony HP, Radbruch A, Dörner T. *In vivo* production of mucosal plasmablasts independent of circulating CD20<sup>+</sup> B cells.
- Heine G, Unterwalder N, Lahl A, Drozdenko G, **Mei H**, Dörner T, Radbruch A, Volk HD, Worm M. Safety of cholecalciferol supplementation and impact on tetanus-specific immunization.
- **Mei H**, Frölich D, Radbruch A, Dörner T. Functional heterogeneity of human bone marrow plasma cells.

Besuch wissenschaftlicher Konferenzen und Symposien (Auswahl)

- Keystone meeting „B cells in context“, Taos, NM, USA, 24. 2. - 28. 2. 2009
- Jahrestreffen 2008 des MUVAPRED-Programms (EU), Siena, Italien, 26. - 28. 11. 2008
- ACR/ARHP Annual Scientific Meeting (2008), San Francisco, USA, 24. - 29. 10. 2008
- 36. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Berlin, Deutschland, 24. - 27. 9. 2008
- Jahrestreffen der DGfI/ÖGAI, Wien, Österreich, 3. - 6. 9. 2008
- 7. European Lupus Meeting, Amsterdam, Niederlande, 7. - 10. 5. 2008
- 6. B-Zell-Forum der DGfI, Grainau/Bad Eibsee, Deutschland, 10. - 12. 4. 2008
- 4. Spring school of Immunology, Ettal, Deutschland, 3. - 7. 3. 2008
- 3. MASIR (measurement of antigen-specific immune responses) Konferenz, La Plagne, Frankreich, 30. 1. - 2. 2. 2008
- MIVAC/MUVAPRED Konferenz, Göteborg, Schweden, 19.-22. 1. 2008
- 5. B-Zell-Fourm der DGfI, Bad Bevensen, Deutschland, 30. 4. - 2. 5. 2007

- Cellaid Symposium, Berlin, Deutschland, 20. - 21. 6. 2005
- 15. Germinal Center Conference, Potsdam, Deutschland, 20. - 24. 4. 2005

### **Förderung**

Die Arbeit wurde am Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin (DRFZ) und an der Charité Berlin, Institut für Transfusionsmedizin, durchgeführt. Beide Institutionen werden vom Land Berlin unterstützt. Das DRFZ ist Mitglied der Leibniz-Gesellschaft. Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) durch die Projekte SFB421/B13 und DFG/Do 5-5,7,8 gefördert. Die Teilnahme am MASIR-Kongress wurde von GlaxoSmithKline Stiftung (München, Deutschland) unterstützt. Experimente zur therapeutischen B-Zell-Depletion wurden im Rahmen einer Anwendungsstudie durch die Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland, durch Verbrauchsmittel und Zurverfügungstellung klinischer Daten unterstützt.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Allen, die mich auf dem Weg zur Promotion unterstützt haben. Thomas Dörner und Andreas Radbruch danke ich für ihre erstklassige Betreuung und für die Möglichkeit, diese Arbeit im DRFZ anfertigen zu können, sowie ferner für ihre finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeiten, für Motivation, die Bereitschaft zur Diskussion und die stets konstruktive Kritik.

Für die exzellente Zusammenarbeit im Labor danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, vor allem Karin Reiter, Daniela Frölich, und Capucine Daridon.

Rudi Manz verdanke ich die Begeisterung für die Thematik der Plasmazellen und des humoralen Gedächtnisses und die Entscheidung, auf diesem Gebiet zu promovieren.

Außerdem danke ich Martin Szyska, Bimba Hoyer, Annett Jacobi, Take Yoshida, Lorena Martinez-Gamboa, Wondossen Sime, Guido Heine und Uli Scherer sowie Falk Hiepe, Elke Luger, für die gute Zusammenarbeit und fachliche Diskussionen. Zu großen Dank bin ich allen Mitarbeitern auf der 1. und 3. Etage für das kollegiale Miteinander und für die Gewährung von Laborasyl verpflichtet.

Dörte Huscher und Joachim Listing danke ich für ein stets offenes Ohr bei statistischen Fragestellungen. Besonderer Dank gilt den Labmanagern für die Herstellung von Antikörperkonjugaten, Puffern und Medien, und für viele Antworten.

Dr. Kathi Thiele, PD Dr. Matziolis und Prof. Perka von der Klinik für Orthopädie der Charité danke ich für die Kooperation bei den Knochenmarksproben, Dr. Julia Benckert und Dr. Hedda Wardemann vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie für die Bereitstellung der Bakterienkultur.

Mein Dank gilt auch allen Ärzten und Patienten, die bei der Rituximab-Anwendungsstudie mitgewirkt haben, insbesondere Prof. Tony von der Uni Würzburg, wie auch allen weiteren Probanden und fleißigen Blutabnehmern.

Beate und Anne danke ich für ihren kritischen Blick auf diese Arbeit.

Meiner Mutter, meinen Freunden und Anne gilt mein allergrößter Dank für ihre Geduld, Toleranz, Motivation und Unterstützung.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Literaturquellen angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.